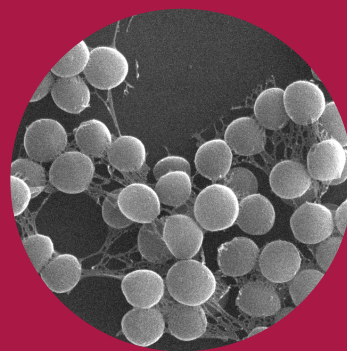
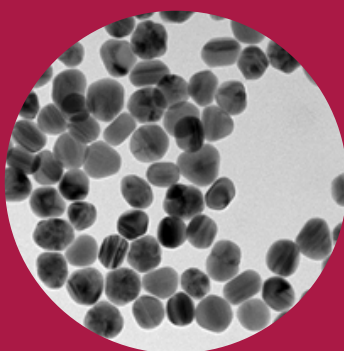




UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y DE METALOIDES. EVALUACIÓN DE SU INTERACCIÓN CON POBLACIONES BACTERIANAS PARA APLICACIONES EN EL ÁMBITO ALIMENTARIO



BEATRIZ GÓMEZ GÓMEZ



DIRECTORAS:

YOLANDA MADRID ALBARRÁN

M^a TERESA PÉREZ CORONA

TESIS DOCTORAL
MENCIÓN INTERNACIONAL

MADRID, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y DE METALOIDES. EVALUACIÓN DE SU INTERACCIÓN CON POBLACIONES BACTERIANAS PARA APLICACIONES EN EL ÁMBITO ALIMENTARIO.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

BEATRIZ GÓMEZ GÓMEZ

Directoras

Yolanda Madrid Albarrán
M^aTeresa Pérez Corona

Madrid, 2020

A MIS PADRES Y MI HERMANO

***“La ciencia no solo es una disciplina de la razón,
sino también del romance y de la pasión”***

Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

Durante el largo y complicado proceso que supone la realización de un Doctorado he tenido la suerte de contar con el apoyo de muchas personas, sin las cuales hubiera sido imposible conseguir llegar hasta el final. Por ello, a través de estas líneas, quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado durante esta etapa y que han formado parte, de una manera u otra, de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis directoras, la Dra. Yolanda Madrid Albarrán y la Dra. M^a Teresa Pérez Corona, por ser para mí una excelente guía durante este camino, por compartir conmigo toda su experiencia y sabiduría en el ámbito de la ciencia y la investigación, y por todo vuestro trabajo y dedicación. También por ser un gran apoyo en la parte personal, porque una Tesis Doctoral no solo es una etapa de desarrollo profesional sino también de superación y de crecimiento a nivel personal y humano, y sin ninguna duda también habéis contribuido a ello. Gracias de todo corazón por ser mucho más que simplemente unas “jefas”.

Dar las gracias también a todo el personal del Departamento de Química Analítica, tanto a los técnicos como a los profesores, por su ayuda desinteresada y soporte técnico. También al Departamento de Genética, Ecología y Microbiología de la Facultad de Biología por su gran acogida. En especial mencionar a Lucía, Antonio y Susana por introducirme en el mundo de la microbiología, por haberme permitido realizar parte de este trabajo en sus laboratorios y por enseñarme tantas cosas, pero sobre todo mil gracias por vuestra buena disposición y por tratarme siempre con tanto cariño.

Gracias a todos los técnicos de los centros de apoyo a la investigación, en especial a los del Centro Nacional de Microscopía Electrónica y al Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, donde he podido obtener muchos de los resultados presentados en esta memoria gracias a las horas invertidas en sus microscopios.

Es evidente que esta etapa no hubiera sido lo mismo sin las personas que te acompañan durante el día a día en el laboratorio. No tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy a todos los componentes de mi grupo de investigación, tanto a los doctorandos como a los *seniors*, cada uno de vosotros sois parte de esta Tesis. Hacer especial mención a las tres personas que se han convertido en amigos para toda la vida, Gustavo, Esther y Emma, por hacer de esta dura etapa, una de las experiencias más bonitas que he vivido hasta ahora, por compartir los buenos momentos y por acompañarme en los no tan buenos. Gustavo, mi compañero incondicional, la persona que ha estado a mi lado

desde casi mis inicios, al que podría dedicarle hojas y hojas y me quedaría corta. Gracias por cada uno de los momentos compartidos en el laboratorio, por todas nuestras “liadas”, por confiar tanto en mí, por estar siempre dispuesto a ayudarme. Sabes que siempre estaré ahí y que lo que está claro es que juntos formamos un gran equipo. Esthercita, mi bailarina, muchas gracias por tu bondad, por aportar alegría a esta etapa, por hacer compras conmigo en los ratos libres y hacer que me sienta menos culpable, por ser mi primera “profe de baile” y descubrirme ese mundillo, por todos tus detalles y generosidad. Emma, estoy muy feliz de que hayas formado parte de la última etapa de mi Tesis, gracias por todos tus consejos, por todas nuestras charletas y por hacer tan sencillo que te conviertas en una muy buena amiga. A Sandra, gracias por ayudarme tanto en mi época “SILAC”, por toda tu paciencia, y por siempre estar dispuesta a compartir conmigo tus conocimientos y cualquier otra cosa. Agradecer también de manera especial a la profesora M^a Eugenia de León, un gran apoyo tanto científico como personal en esta etapa, gracias por todo lo que me has enseñado. Por supuesto, muchas gracias también al resto de componentes: Milagros, Mariluz, Jose, Rían, Jon, Conchita, Noelia, Estefanía M., David, Mari, Héctor, Estefanía G., y a los que han venido a visitarnos durante sus estancias Micaela, Marina, Fernando...

Por otro lado, agradecer también a la Dra. Heidi Goenaga Infante por darme la oportunidad de realizar mi estancia de investigación en el LGC y a todos los componentes de su grupo por la gran acogida que me dieron. A Susana, Isa, Pablo, Estela, David, Olga...gracias por toda vuestra ayuda, apoyo y por acompañarme con tanto cariño durante mi etapa londinense.

Del mismo modo, agradecer también a la profesora María Montes Bayón por permitirme realizar los últimos experimentos de esta Tesis en su laboratorio, y, por supuesto, a todo el grupo de Espectrometría de Masas y Análisis Biomédico (EMAB) de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo por su simpatía, cercanía y hacer tan fácil mi estancia allí, gracias a todos.

Y muy especialmente quiero dar las gracias a mi familia y amigos porque, aunque no han estado conmigo durante las horas de laboratorio, son una parte fundamental de mi vida y han contribuido en gran medida a que todo este trabajo saliera adelante.

A mis amigas de toda la vida; a mis amigas del pueblo, por escucharme, por aguantarme hablar de tantos agobios, por apoyarme, para mí compartir momentos con vosotras han sido un gran alivio, muchísimas gracias; y como no, a mis “Maritrinis”, hemos compartido carrera pero sobre todo muy buenos momentos.

Y por encima de todo, a mis padres y mi hermano. Es muy complicado poder encontrar una palabra que pudiera expresar cuanto os quiero y lo afortunada que me siento de teneros. Papá, eres la persona más generosa que conozco, gracias por siempre darme lo mejor. Pablo, siempre dispuesto a ayudarme y a organizarme cualquier cosa que te pedía, gracias por darme tu visión de las cosas tan diferente a la mía, pero que muchas veces ha significado tanto para mí. Mamá, mi todo, lo mejor que tengo, mi gran apoyo, sin ninguna duda esto no hubiera sido posible sin ti, gran parte de este trabajo es gracias a ti... gracias por todas tus palabras de consuelo, gracias por intentar comprender cada cosa que te contaba de este mundillo, por alegrarte por cada artículo aceptado, por escuchar todas y cada una de mis exposiciones, nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí.

Por último, agradecer todo su apoyo y comprensión a mi otro gran pilar, Jorge. Gracias por tus consejos, por tus ánimos, por estar siempre a mi lado en esta etapa tan importante para mí, por darme siempre la fuerza necesaria para continuar. Muchísimas gracias.

A todos vosotros, **MUCHAS GRACIAS.**

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	3
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	13
1. Aplicaciones más relevantes de las nanopartículas metálicas y de metaloides en la industria alimentaria	14
1.1. Nanopartículas en el procesado de alimentos	14
1.2. Nanopartículas en el desarrollo de envases alimentarios	16
1.3. Nanopartículas como plataformas sensoras para el control de calidad de los alimentos	20
2. Procesos regulados por <i>quorum sensing</i> (QS). Formación de biopelículas en la industria alimentaria	22
2.1. <i>Quorum sensing</i> : sistemas de comunicación bacteriana	22
2.2. Inhibición de los sistemas QS	25
2.3. Formación de biopelículas bacterianas en la industria alimentaria y en el sector clínico	28
2.4. Interacción de nanopartículas con poblaciones bacterianas. Mecanismos de acción	33
3. Riesgos asociados a la exposición a los nanomateriales. Marco legislativo para su regulación en el campo de la alimentación	37
3.1. Rutas de exposición a los nanomateriales empleados en la industria alimentaria	37
3.2. Legislación Europea sobre el empleo de nanomateriales en la industria alimentaria	41
4. Nanopartículas basadas en selenio y telurio como alternativa a las nanopartículas metálicas convencionales	45
4.1. Nanopartículas de selenio	46
4.2. Nanopartículas de telurio	55
5. Detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas metálicas/metaloides en matrices complejas	58
5.1. Técnicas de microscopía electrónica	60
5.2. Difracción de rayos X	61
5.3. Técnicas de dispersión de la luz	62
5.4. Técnicas de separación	64

5.5. Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) para el análisis de nanopartículas. Single particle-ICP-MS.....	69
6. Metodologías analíticas para la evaluación de los efectos biológicos producidos por nanopartículas en comunidades bacterianas	74
6.1. Efecto de las nanopartículas en la densidad poblacional bacteriana. Estudios de viabilidad	74
6.2. Empleo de la microscopía electrónica para la evaluación de la internalización y localización intracelular	76
6.3. ICP-MS como herramienta para el estudio de la acumulación de nanopartículas metálicas/metaloideas en células individuales	77
6.4. Estudios de especiación para evaluar la biotransformación de nanopartículas metálicas/metaloideas en células bacterianas	79
6.5. Técnicas de proteómica cuantitativa para la elucidación de los mecanismos implicados en la biotransformación de nanopartículas metálicas/metaloideas por poblaciones bacterianas	81
6.6. Técnicas para el estudio del efecto de las nanopartículas en la biomasa total y en la estructura de biopelículas bacterianas	87
OBJETIVOS	93
OBJECTIVES	97
CAPÍTULO 1: Estudio de la interacción de distintas formas químicas de selenio (SeO ₃ ²⁻ y SeNPs) con bacterias ácido lácticas (LAB) mediante HPLC-ICP-MS y estrategias de proteómica cuantitativa. Aplicación al desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en selenio	103
Artículo 1: Perspectivas alimentarias de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 636 y <i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1101 enriquecidos con selenio	107
Artículo 2: Análisis proteómico cuantitativo basado en la estrategia SILAC para el estudio de la respuesta de <i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1101 a la presencia de selenito y nanopartículas de selenio	117
CAPÍTULO 2: El cinc (Zn ²⁺ y ZnONPs) como aditivo en la industria alimentaria. Evaluación de los riesgos asociados al uso de ZnONPs en el desarrollo de envases activos	157
Artículo 3: Evaluación de la biodisponibilidad de cinc en fórmulas infantiles mediante métodos <i>in vitro</i> (solubilidad y dializabilidad) y cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) acoplada a ICP-MS	161

Artículo 4: ICP-MS en modo de detección de partículas individuales como técnica analítica para evaluar el efecto de la matriz alimentaria en las propiedades físico-químicas y la estabilidad gastrointestinal de ZnONPs liberadas de envases alimentarios	173
CAPÍTULO 3: Evaluación del efecto de nanopartículas metálicas y de metaloides sobre comportamientos bacterianos regulados por <i>quorum sensing</i> . Formación de biopelículas bacterianas	187
Artículo 5: Elucidación de los mecanismos responsables de la disrupción del <i>quorum sensing</i> bacteriano mediante nanopartículas metálicas	191
Artículo 6: Efecto de nanopartículas basadas en telurio en la biomasa y arquitectura de biopelículas bacterianas. Dificultades asociadas a la caracterización de nanopartículas en organismos vivos	203
Artículo 7: Alteración de los procesos regulados por quorum sensing, producción de violaceína y formación de biopelículas bacterianas, por nanopartículas de selenio y telurio	251
CAPÍTULO 4: Aplicación de la técnica “single cell-ICP-MS” (SC-ICP-TQ) para establecer perfiles de acumulación y biotransformación de TeNPs en células individuales de bacterias de interés en la industria alimentaria	267
Artículo 8: Análisis por ICP-MS en modo de detección de células individuales y partículas individuales (SC/SP-ICP-MS) para evaluar cuantitativamente la asimilación de nanopartículas de telurio (TeNPs) en poblaciones bacterianas modelo y los cambios morfológicos como consecuencia de la interacción bacteria-nanopartícula	269
DISCUSIÓN INTEGRADORA	311
CONCLUSIONES	345
CONCLUSIONS	349
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	355
GLOSARIO DE TÉRMINOS	389
ANEXO A: Capítulo de libro.” La nanotecnología en el ámbito alimentario. Aplicación de las nanopartículas metálicas”	393
ANEXO B: Producción científica.....	437

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La nanotecnología constituye en la actualidad una herramienta muy útil para mejorar muchos procesos tecnológicos e industriales. Este hecho ha provocado que la nanotecnología se encuentre presente en muchos ámbitos de nuestras vidas, incluso en una gran variedad de productos de consumo. La nanotecnología y los nanomateriales se han incorporado a la industria alimentaria para multitud de aplicaciones. Muchas de ellas se están estudiando, desarrollando e incluso aplicando en las diferentes etapas de la cadena de producción, que van desde la propia elaboración del alimento hasta su envasado. En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la evaluación de las potenciales aplicaciones de un tipo de nanomateriales (nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos y metaloides) en la industria alimentaria, fundamentalmente aquellas basadas en su efecto sobre poblaciones microbianas. Los estudios se han llevado a cabo en dos tipos de poblaciones bacterianas: bacterias ácido lácticas, ampliamente utilizadas en la industria alimentaria por sus efectos beneficiosos para la salud; y patógenos comunes del sector alimentario que son capaces de formar biopelículas. Asimismo, se han considerado dos tipos de nanopartículas: nanopartículas metálicas (nanopartículas de óxido de cinc (ZnONPs), de plata (AgNPs) y de dióxido de titanio (TiO₂NPs)), y otro tipo de partículas, como las nanopartículas de selenio (SeNPs) y telurio (TeNPs), que se proponen como alternativa a las anteriores por sus excelentes propiedades y, en algunos casos, menor toxicidad. Por otro lado, dentro de este objetivo principal se encuentra además implícita la evaluación de los posibles efectos adversos que el empleo de la nanotecnología puede ocasionar tanto para el consumidor como para el medio ambiente.

En cuanto al primer grupo de microorganismos, bacterias ácido lácticas (LAB), se ha llevado a cabo la evaluación de diferentes formas químicas de selenio (selenito y SeNPs) y diferentes especies bacterianas para el desarrollo de alimentos funcionales, en concreto productos fermentados o probióticos enriquecidos en este elemento esencial. Los resultados obtenidos evidenciaron que las dos especies de LAB ensayadas, *L. acidophilus* CRL 636 y *L. reuteri* CRL 1101, fueron capaces de acumular y biotransformar el selenio, añadido como SeO₃²⁻, principalmente a SeMet y SeCys, formas químicas del selenio que presentan una menor toxicidad y un mayor valor nutricional. La cepa *L. reuteri* CRL 1101 proporcionó los mejores porcentajes de acumulación y biotransformación de selenio. Además esta cepa presentó una mayor resistencia frente a las condiciones de pH derivadas de la digestión gastrointestinal y a la presencia de sales biliares, factores importantes a tener en cuenta cuando se desarrolla un alimento funcional a partir de este tipo de microorganismos. Basándonos en el comportamiento de esta cepa, se aplicó la estrategia

de marcaje metabólico SILAC, en combinación con la espectrometría de masas, para profundizar en los mecanismos involucrados y establecer el efecto de las distintas formas químicas de selenio (selenito o SeNPs) sobre la expresión de proteínas de las LAB. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la presencia de ambas formas de selenio provocaba la sobreexpresión de proteínas directamente relacionadas con el metabolismo del selenio, en concreto, con la producción de selenoaminoácidos como SeCys y SeMet. Sin embargo, es importante resaltar que la sobreexpresión de proteínas fágicas y chaperonas (relacionadas con respuestas frente a factores de estrés) solo se observó en los ensayos realizados con selenito. Este dato parece sugerir que las bacterias lácticas son más tolerantes a la presencia de SeNPs que de selenito.

El cinc es otro elemento esencial para el correcto desarrollo del organismo, cuya carencia puede ocasionar la aparición de enfermedades. La deficiencia de Zn adquiere especial gravedad durante el crecimiento y el desarrollo infantil. Aunque, en un principio, la leche materna constituye la principal fuente de alimentación durante los primeros meses de vida, frecuentemente es necesario el empleo de fórmulas infantiles para satisfacer los requerimientos nutricionales de los lactantes. En las fórmulas lácteas infantiles se suele añadir el cinc en distintas formas químicas, cuya biodisponibilidad depende de la forma química añadida y de los componentes y tratamiento de las formulaciones. En este contexto, en la presente Tesis Doctoral se han estudiado la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del cinc en distintos tipos de fórmulas infantiles (basadas en leche de vaca y soja) mediante modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* y estudios de especiación empleando el acoplamiento SEC-ICP-MS. A pesar de que los modelos *in vitro* reflejaron una baja biodisponibilidad del cinc en la mayoría de las fórmulas infantiles estudiadas, los análisis mediante SEC-ICP-MS, por el contrario, evidenciaron que el cinc se encontraba unido a proteínas de bajo peso molecular (<10 KDa), lo suficientemente pequeñas como para adsorberse a través de las paredes del intestino. Estos resultados demuestran que el acoplamiento SEC-ICP-MS es una herramienta muy útil en este tipo de estudios, y puede considerarse como técnica complementaria a los métodos *in vitro* empleados para el estudio de la biodisponibilidad de elementos traza en alimentos.

Por otro lado, también se ha propuesto el uso de este elemento en forma de ZnONPs para el desarrollo de envases activos por sus excelentes propiedades antimicrobianas y bloqueantes de la radiación UV. Sin embargo, la presencia de este tipo de nanopartículas en envases alimentarios puede conllevar riesgos como consecuencia de su posible migración desde el envase al alimento. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral,

se evaluaron las transformaciones de las propiedades físico-químicas de las ZnONPs en su migración desde el envase a la matriz alimentaria contenida (zumo de naranja o pechuga de pollo). Las características de las ZnONPs analizadas fueron el tamaño, distribución de tamaño, y concentración de fracción disuelta y particulada. Para este estudio se aplicaron las técnicas de SP-ICP-MS y TEM. En el caso de la pechuga de pollo se pudo determinar que alrededor del 72 % del cinc que migraba desde el envase a este alimento estaba en forma de nanopartícula. Sin embargo, en el caso del zumo de naranja, solo se pudo observar mediante TEM la disminución en el tamaño de ZnONPs en su contacto con la matriz alimentaria. La elevada concentración de Zn disuelto dificultó la aplicación de la técnica SP-ICP-MS en la matriz de zumo de naranja. Por otro lado, la aplicación de modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* permitió establecer el comportamiento de dichas partículas en el tracto gastrointestinal, evidenciando que las ZnONPs pueden alcanzar las paredes del intestino en forma de agregados, de pequeñas partículas, y/o en forma de iones disueltos en función de la matriz alimentaria a la que se haya producido la migración.

El segundo grupo de microorganismos objeto de estudio en esta memoria está constituido por bacterias formadoras de biopelículas, de especial interés en la industria alimentaria. La formación de biopelículas bacterianas en superficies en contacto con alimentos supone un grave problema de seguridad alimentaria y de salud pública, además de generar elevadas pérdidas económicas. Una de las estrategias más recientes e innovadoras para hacer frente a este problema es la interrupción de los sistemas de comunicación bacteriana, conocidos como *quorum sensing* (QS), y que son responsables del desarrollo de las biopelículas microbianas. En esta memoria se ha estudiado el efecto que tienen distintos tipos de nanopartículas (AgNPs, ZnONPs, TiO₂NPs, SeNPs y TeNPs) en los sistemas QS de la especie bacteriana Gram negativa *Chromobacterium violaceum*, la cual se utiliza como especie biosensora debido a que produce un pigmento de color morado, estando este proceso de formación del pigmento regulado por QS. Aunque todas las nanopartículas estudiadas provocaron una disminución de dicho pigmento y, por tanto, la interrupción del QS, este efecto fue dependiente de la composición, concentración, tamaño y recubrimiento de las nanopartículas. Otras estrategias empleadas para combatir la formación de biopelículas implican inhibir la adhesión inicial de los microorganismos a las superficies, alterar la estructura de la biopelícula o inducir la dispersión de la misma. La capacidad de las SeNPs y TeNPs para producir estos efectos se determinó en patógenos que ocasionan graves problemas de seguridad alimentaria, como son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se recurrió a la combinación de técnicas colorimétricas, junto con la microscopía confocal láser de barrido (CLSM) y

posterior tratamiento bioinformático de las imágenes obtenidas. La reconstrucción 3D de estas imágenes evidenció que la presencia de SeNPs y TeNPs originaba una importante distorsión en la estructura de la biopelícula formada por estos patógenos inhibiendo gran parte de su biovolumen y disminuyendo su capacidad de adhesión.

Por último, la aplicación de la técnica ICP-MS en modo de detección de células individuales (SC-ICP-MS), junto con la difracción de RX y TEM, ha permitido determinar la acumulación, localización y transformación de las TeNPs en poblaciones bacterianas planctónicas de *S. aureus* y *E. coli* a nivel de células individuales. Este tipo de análisis ha hecho posible establecer la masa total de telurio, y el número de partículas acumuladas por cada célula en ambos cultivos bacterianos, lo que permite trazar con mayor precisión y significado biológico los perfiles de acumulación de este tipo de nanopartículas en organismos vivos. Asimismo, los análisis por SP-ICP-MS junto con TEM han posibilitado estimar las dimensiones (anchura y longitud) de las nanovarillas de TeNPs originadas por la interacción de las TeNPs esféricas originales con las especies bacterianas estudiadas. Cabe destacar que es la primera vez que se aplica la técnica de SC-ICP-MS a poblaciones bacterianas en estudios de interacción con nanopartículas.

SUMMARY

Nowadays, nanotechnology is considered as a useful tool for improving several industrial and technological processes. Due to this fact, nanotechnology can be found in many areas of our daily life, being part of a wide variety of consumer products. In this sense, nanomaterials have been introduced into the food sector for several applications. Most of them are currently being studied, developed and even applied in the different steps of the production chain, from food processing to packaging. In this context, the main objective of this Doctoral Thesis is the evaluation of the potential applications of metal (AgNPs, ZnONPs y TiO₂NPs) and metalloid (SeNPs y TeNPs) based- nanoparticles in the food sector, with special emphasis on their effect on different bacterial populations. Two types of bacterial populations have been considered: foodborne pathogenic bacteria which are capable of forming biofilms, and lactic acid bacteria with health and nutritional benefits. Likewise, two groups of nanoparticles have been selected: metallic nanoparticles (ZnONPs, AgNPs and TiO₂NPS) and metalloid nanoparticles such as SeNPs and TeNPs which are proposed as alternative to the former, due to their excellent properties and, in some cases, lower toxicity. Furthermore, this general aim also includes the evaluation of the risks associated to the use of nanotechnology for both consumers and environment.

Regarding to lactic acid bacteria (LAB), different bacterial species and different chemical forms of selenium (selenite and SeNPs) have been evaluated with the aim of developing functional food, particularly for being directly administrated as Se-enriched probiotics or for formulating fermented products containing Se-enriched bacteria. Results evidenced that both *Lactobacillus* strains, *L. reuteri* CRL 1101 and *L. acidophilus* CRL 636, were able to accumulate and biotransform Se (added as SeO₃²⁻) mainly into SeMet and SeCys, with a lower toxicity and higher nutritional value than the inorganic forms of selenium. *L. reuteri* 1101 showed the highest effectiveness in producing SeMet and SeCys together with a high resistance to the physiological conditions that occur in the gastrointestinal tract even in presence of bile salts, a key parameter when a functional food based on this type of microorganism, is developed. Moreover, a quantitative proteomic approach (SILAC) has been applied to evaluate the effect of Se species (selenite or SeNPs) on *L. reuteri* CRL 1101 metabolisms and protein expression. Results evidenced the overexpression of proteins directly related to selenium metabolism, specifically with the production of selenoaminoacids such as SeCys and SeMet. In contrast, the overexpression of phage proteins and chaperones (proteins related to responses against stress conditions) were observed only when selenite was added to the culture medium.

This result suggests that selenium supplementation as SeNPs produced a less deleterious effect on *L. reuteri* CRL 1101 than selenite.

Zinc is an essential element that plays a key role in health and, thus, a low status of this element in the organism could lead to the appearance of diseases. In this sense, zinc deficiency becomes particularly severe during child growth and development. Although breast milk is the main source of Zn for the first months of life, sometimes the employment of infant formula is required to fulfil the nutritional requirements of infants. Zinc bioavailability in infant formula highly depends on the chemical forms in which Zn is added, and also on the ingredients and type of treatment applied to the formulation. In this context, zinc bioaccessibility and bioavailability have been studied in different kind of infant formula (based on cow and soya milk) by means of applying *in vitro* gastrointestinal digestion model and SEC-ICP-MS measurements. Although *in vitro* models revealed a low percentage of Zn bioavailable in most of infant formulas tested, SEC-ICP-MS analysis evidenced that zinc was bound to low-molecular-weight proteins (<10 KDa), which are small enough to be absorbed through the intestine walls. This suggests the applicability of SEC-ICP-MS to support results provided by the *in vitro* gastrointestinal methodologies.

On the other hand, zinc as nanoform (ZnONPs) has been considered as active ingredient to develop food active packaging materials, due to their excellent antimicrobial and UV-light barrier properties. However, the migration of nanoparticles from packaging to food may entail serious risks for consumers. Hence, in the current Doctoral Thesis, the transformations underwent by ZnONPs during the different steps of their route from packaging to the consumer have been evaluated. For this purpose parameters such as particle size and size distribution, nanoparticle concentration and the dissolved metal fraction of ZnONPs migrated from packaging to food (orange juice and chicken breast) have been studied by means of SP-ICP-MS and TEM analysis. In case of chicken breast samples, a 72 % of zinc migrated to this food matrix was quantified as nanoparticles smaller than 95 nm. Nevertheless, ZnONPs characterization in orange juice was not possible due to the presence of high levels of dissolved zinc which greatly limited the applicability of SP-ICP-MS measurements. Furthermore, the application of an *in vitro* gastrointestinal digestion model enabled to establish the behaviour of these nanoparticles in the gastrointestinal tract. Results evidenced that ZnONPs may reach the intestine walls as aggregates, as small particles (< 3 nm), and/or as ionic zinc depending on the nature of the food matrix.

The second group of microorganisms evaluated were bacteria able to form biofilm in different scenarios of food industry. Bacterial biofilm formed on food-contact surfaces can lead to serious food safety problems and public health risk, as well as significant economic losses. Disruption of the bacterial communication system, known as *quorum sensing* (QS), which regulates biofilm formation, is nowadays being explored as a powerful strategy to fight against this problem. Thus, in this work, the effect of different nanoparticles (AgNPs, ZnONPs, TiO₂NPs, SeNPs and TeNPs) on bacterial QS of *C. violaceum* has been assessed. This Gram negative bacterium regulates the production of the purple pigment violacein by a QS mediated process. All nanoparticles tested caused a relevant decrease on the amount of the pigment produced and, therefore, the disruption of the QS. This effect was dependent on the nature and concentration of nanoparticles. Other strategies employed to overcome biofilm formations involve the following approaches: inhibition of initial bacterial adhesion, alteration of biofilm structure or dispersion of the biofilm. So, the ability of SeNPs and TeNPs to produce these effects on biofilms developed by pathogens (*S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*) that originate serious food safety problems was studied. For this purpose, the combination of colorimetric techniques along with confocal laser scanning microscopy and digital image processing were applied. 3D projections of bacterial biofilm evidenced that the presence of SeNPs and TeNPs produced a severe distortion on biofilm structure, as well as decreasing biofilm biovolume and their ability to attach to surfaces.

Finally, the application of ICP-MS in single cell mode (SC-ICP-MS) together with TEM and RX analysis allowed us to evaluate the accumulation, fate and transformation of TeNPs in planktonic bacterial populations of *S. aureus* y *E. coli* at single-cell levels. Thus, the mass and number of TeNPs accumulated in individual cells were established in both bacterial cultures, which enabled to trace the assimilation profiles of these nanoparticles in living organisms with greater precision and biological significance. Moreover, the use of SP-ICP-MS together with TEM has given us the opportunity to perform the dimensional characterization of the rod-shaped TeNPs produced as a result of the compositional and morphological changes (from nanospheres to nanorods) of TeNPs as consequence of their interaction with bacterial species. It is important to highlight that SC-ICP-MS analysis have been applied for the first time to study nanoparticles accumulation in bacterial individual cells.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se encuentra presente en la actualidad en multitud de aplicaciones de muy diversas áreas, originando un notable impacto tanto en la industria como en el campo de la ciencia y la tecnología. Según las directrices establecidas por la Unión Europea (EU, 2011a), se define nanomaterial como aquel material de origen natural o manufacturado, en el que el 50 % o más de sus partículas, tanto dispersas como agregadas o aglomeradas, tienen al menos una dimensión entre 1 y 100 nm. Además, se especifica que el umbral del 50 % puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y el 50 % en el caso de que exista una sospecha relacionada con los efectos nocivos del nanomaterial.

El enorme interés que suscitan estos materiales de escala nanométrica reside en el hecho de que tienen propiedades físico-químicas muy diferentes a sus análogos de mayores dimensiones, conocidos como materiales “bulk” (mayor masa y volumen). Una de las principales diferencias entre un material bulk y su equivalente en tamaño nanométrico es el incremento de la relación área superficial/masa del material, lo que se traduce en un aumento de su reactividad en un factor de aproximadamente 1000 veces. Analogamente, las propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas de los nanomateriales también son diferentes al mismo material a escala micrométrica, debido al confinamiento electrónico que hace que predominen los efectos cuánticos cuando las dimensiones del material están por debajo de un tamaño crítico comparable con la escala nanométrica (Adams & Barbate, 2013).

Todas estas propiedades especiales hacen que los nanomateriales constituyan en la actualidad una vía de mejora importante para muchas aplicaciones científico-tecnológicas. De entre ellos, las nanopartículas metálicas (Ag, Au, Fe) y de óxidos metálicos (TiO₂, ZnO, SiO₂, CeO₂) han suscitado un notable interés para su aplicación en sectores industriales tan diversos como la industrias farmacéutica, alimentaria, textil y cosmética, en electrónica, en medicina, en la producción de energías renovables, y también en aplicaciones medioambientales, como por ejemplo para la eliminación de contaminantes en aguas residuales (De la calle *et al.*, 2016; Yadavalli & Shukla, 2017; Adawi *et al.*, 2018; Lead *et al.*, 2018).

1. Aplicaciones más relevantes de las nanopartículas metálicas y de metaloides en la industria alimentaria.

Aunque la presencia de los nanomateriales en áreas muy diversas se ha incrementado enormemente, cabe destacar el crecimiento exponencial que ha tenido la nanotecnología en el campo de la industria y tecnología de los alimentos. En el caso particular de las nanopartículas de metales y metaloides, y sus respectivos óxidos, estos tipos de nanomateriales se han empleado, en prácticamente todos los sectores del ámbito alimentario, desde la producción del alimento hasta su envasado. Todo ello con la finalidad de mejorar la producción, la conservación y la calidad nutricional del alimento (Abbas *et al.*, 2009; Cushen *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2014). A continuación, se van a describir con mayor detalle algunas de las aplicaciones más destacadas de este tipo de materiales en el sector alimentario (Figura 1).

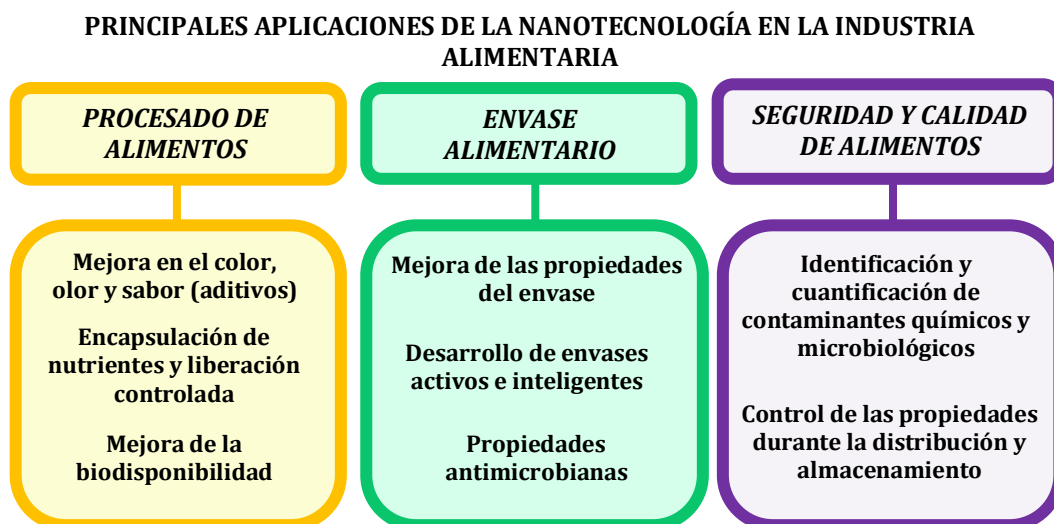


Figura 1. Principales aplicaciones de la nanopartículas en el sector alimentario.

1.1. Nanopartículas en el procesamiento de alimentos.

Las nanopartículas se utilizan en el procesamiento de los alimentos con distintos objetivos: mejorar su color, sabor y textura; enmascarar un sabor u olor indeseable y/o aumentar su funcionalidad y valor nutricional a través de la encapsulación de nutrientes como vitaminas, minerales e incluso nutraceuticos. La encapsulación de nutrientes y compuestos bioactivos facilita la liberación controlada de los mismos, protegiéndolos de la degradación, y mejorando así su biodisponibilidad. No obstante, estas últimas aplicaciones están todavía en fase de desarrollo, y están además pensadas, sobre todo, para nanopartículas de naturaleza orgánica de tipo poliméricas o dendríticas, liposomas, emulsiones, etc. (Adeyeye & Fayemi, 2018; Singh *et al.* 2017b).

Las nanopartículas derivadas de metales o metaloides (SiO₂, TiO₂, Ag), se están empleando actualmente como aditivos alimentarios. Para ser exactos lo que se utiliza es el correspondiente compuesto en forma macro. Sin embargo, en muchos alimentos se han encontrado en forma de nanopartículas que, en la mayoría de los casos, no se han adicionado de forma intencionada, sino que aparecen debido a la forma de manufacturación del propio aditivo. El dióxido de silicio (aditivo E551) es un antiaglomerante que se se emplea para evitar el apelmazamiento de productos en formato polvo o grano, como pueden ser el café o las sopas instantáneas, sazónadores, cacao o preparados para la elaboración de panes y pasteles, o en harinas para frituras; y en otro tipo de productos, como pueden ser chicles y caramelos (Yusoff *et al.* 2018). De forma similar, el dióxido de titanio (E171) se ha empleado como agente blanqueante y fijador del color, sobre todo en productos lácteos, salsas, helados, dulces, y también en chicles y caramelos (Dudefoi *et al.* 2017). Asimismo, la plata es un aditivo alimentario aprobado por la Unión Europea (EU) (E174) que se utiliza principalmente como cobertura de azúcar para la fabricación de perlas como adornos de repostería. Todos ellos son aditivos alimentarios autorizados por la EU, por lo que aparecen en la lista de aditivos permitidos en el Reglamento (CE) No 1129/2011, que modifica el anexo II del Reglamento (CE) No 1333/2008 (EU, 2008). Sin embargo, algunos investigadores han alertado sobre la presencia de material nanoparticulado en estos aditivos debido al proceso de manufacturación de los mismos (Petersen *et al.* 2012; Petersen *et al.* 2014b). Estos datos han conducido a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, European Food Safety Authority) a llevar a cabo una reevaluación de la seguridad de los mismos, recomendando que se incluya en sus especificaciones información relacionada con la distribución de tamaños de dichos aditivos y el porcentaje de partículas del aditivo que se encuentra por debajo de los 100 nm (EFSA, 2016a; EFSA, 2016b; EFSA, 2018; EFSA, 2019).

Asimismo, los compuestos de cinc (en escala macro) tales como sulfato de cinc, acetato de cinc, gluconato de cinc u óxido de cinc se han empleado como aditivos alimentarios para incrementar la biodisponibilidad de este nutriente esencial. El cinc es un elemento traza esencial que interviene en multitud de procesos bioquímicos y es integrante de más de 200 enzimas (Prasad, 1993; Tapiero & Tew, 2003; Harmaza & Slobozhanina, 2014). La principal fuente de Zn es a través de la dieta. Desafortunadamente, ciertos componentes de los alimentos, como la fibra y los fitatos, pueden suprimir o reducir la biodisponibilidad de este elemento. Esta baja biodisponibilidad puede originar estados carenciales impidiendo el correcto funcionamiento del organismo. En niños y jóvenes puede ocasionar retraso en el crecimiento y en el desarrollo neuronal, diarrea o alteraciones inmunitarias (Prasad, 1998;

WHO, 2001). Según la EFSA los valores recomendados de ingesta de cinc en niños van desde 2.6 a 9.63 mg/día en niños, desde 6.8 a 14.5 mg/día en adolescentes y de 8.0 a 14.5 mg/día en adultos (EFSA, 2014).

Se estima que la deficiencia de cinc afecta casi a un tercio de la población mundial, siendo los niños, y las mujeres embarazadas y en periodo de lactancia, los grupos poblacionales más afectados (WHO, 2009). Todo ello evidencia el interés que está adquiriendo el desarrollo de alimentos enriquecidos en cinc con el concurso de la nanotecnología. El número de estudios que contempla la sustitución de los compuestos de Zn anteriormente mencionados por nanopartículas de óxido de cinc (ZnONPs) se ha incrementado en los últimos años. Esto es debido a que estos nanomateriales pueden presentar menores efectos secundarios que las sales de cinc citadas y, además, pueden contribuir a aumentar la biodisponibilidad de este elemento (Liang *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha descrito la preparación de galletas fortificadas con nanopartículas de óxido de cinc para aumentar la eficiencia de absorción de este elemento en el intestino (Hassan, 2016). De la misma manera, se ha considerado el uso de estas nanopartículas como suplemento para alimentación animal (Pei *et al.*, 2019; Abedini *et al.*, 2017).

Las ZnONPs se han empleado además en tratamientos tales como la pasteurización, con el objetivo de conseguir una mayor uniformidad en los procesos de calentamiento, controlar la proliferación de microorganismos, y preservar la textura y las propiedades de los alimentos durante este tipo de tratamientos (Xu *et al.* 2017; Xu *et al.* 2018).

1.2. Nanopartículas en el desarrollo de envases alimentarios.

El empleo de las nanopartículas en envases alimentarios es una de las aplicaciones más relevantes y desarrolladas en el campo de la alimentación. Mientras que muchas de las aplicaciones relacionadas con el procesado de alimentos todavía se encuentran en fase de investigación, la incorporación de nanopartículas a materiales para uso alimentario es en la actualidad una realidad comercial.

El envasado es el procedimiento más utilizado para extender la vida útil del alimento, y preservar su calidad y seguridad durante su distribución y almacenamiento. De manera general, los materiales empleados para la elaboración de envases alimentarios deben tener propiedades mecánicas, ópticas y térmicas adecuadas para actuar como barrera frente a microorganismos, posibles contaminantes químicos, gases (vapor de oxígeno y dióxido de carbono), o incluso frente a determinados sabores y olores (Figura 2)

(Sarkar *et al.* 2017). Los envases alimentarios están compuestos generalmente por una estructura tricapa. Una de las capas proporciona el soporte estructural, otra actúa como barrera al paso de contaminantes, gases u olores, y la última proporciona la propiedad del termosellado al conjunto del envase.



Figura 2. Requerimientos de un material para su uso en envases alimentarios. Adaptación de Rhim *et al.* 2013.

Debido a su versatilidad, termoestabilidad y bajo coste, los materiales más ampliamente empleados para la fabricación de envases alimentarios son los plásticos, constituidos por polímeros sintéticos derivados del petróleo. Algunos de los materiales plásticos tradicionalmente empleados para el envase de alimentos son (Tabla 1): polietileno de alta y baja densidad, poli(etilentereftalato), poliestireno, polietileno, polipropileno, poli(cloruro de vinilo) (Ghanbarzadeh *et al.* 2015).

Tabla 1. Materiales plásticos derivados del petróleo empleados en la industria alimentaria.

Material	Aplicación
Polietileno de alta densidad (PEAD)	Botellas, envases
Polietileno de baja densidad (PEBD)	Botellas, bolsas, <i>film</i>
Poli (cloruro de vinilo) (PVC)	Envases
Poliestireno (PS)	Bandejas, tarrinas
Poli (etilentereftalato) (PET)	Botellas
Polietileno (PE)	<i>Film</i> , bolsas, envases
Polipropileno (PP)	Envases

Sin embargo, estos materiales no son biodegradables lo que supone una gran fuente de generación y acumulación de residuos. Esto ha ocasionado una gran

preocupación a nivel mundial, debido, sobre todo, a los riesgos que pueden ocasionar para el medio ambiente.

El desarrollo de envases alimentarios basados en biopolímeros de origen natural surge como una alternativa prometedora a los envases plásticos procedentes de la industria petroquímica. Para que un biopolímero pueda ser aplicado en el envase alimentario, debe cumplir dos condiciones: proceder de fuentes renovables y mostrar una elevada capacidad de biodegradación. El origen de estos biopolímeros puede ser muy variada: fuentes naturales, procesos de fermentación y, también, pueden ser de origen sintético. La principal fuente de biopolímeros son biomoléculas de origen vegetal o animal, entre las que se encuentran el almidón, la celulosa, el quitosano, el alginato, el agar, la soja, el gluten del trigo, la gelatina, el colágeno, la caseína, etc. Otros pueden obtenerse por fermentación microbiana, como los polihidroxialcanoatos (PHAs), o ser polímeros sintéticos biodegradables de origen renovable, como por ejemplo el ácido poliláctico (PLA). Desafortunadamente, su uso y comercialización a gran escala para la producción de envases alimentarios es todavía limitada debido a sus inadecuadas propiedades mecánicas y físicas, su elevada permeabilidad a gases y vapores y sus elevados costes de producción (Rhim *et al.* 2013).

Por otro lado, otra de las principales áreas de investigación dentro del ámbito del envase alimentario es el desarrollo de sistemas de envasado activos e inteligentes, capaces de mejorar y preservar las propiedades y calidad de los alimentos, alargar su vida útil y mejorar la seguridad alimentaria. En el Reglamento (CE) N° 450/2009 sobre materiales activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos, se definen los materiales activos como “aquellos destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado del alimento envasado”. Estos sistemas están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberan sustancias en el alimento envasado o en su entorno o que absorben sustancias del alimento o de su entorno. De la misma manera, se pueden definir como materiales inteligente “aquellos que controlan el estado de los alimentos envasados o de su entorno”. Además, esta norma especifica que los sistemas inteligentes deben colocarse en la superficie externa del envase, y separarse del alimento mediante una barrera funcional, situada dentro de los materiales en contacto con los alimentos, impidiéndose que migren a estos las sustancias que se encuentran tras ellas (EU, 2009). Por tanto, los envases activos incorporan sustancias para mejorar sus características mecánicas o sus propiedades barreras, mientras que los envases inteligentes posibilitan la monitorización del estado y calidad de los productos de manera directa o indirecta (EU, 2009).

Las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, mayoritariamente plata, oro, óxido de cinc y dióxido de titanio (AgNPs, AuNPs, ZnONPs y TiO₂NPs) se han empleado para el desarrollo de envases. Con su inclusión se busca mejorar, por una parte las propiedades mecánicas y físicas de los envases biodegradables basados en biopolímeros y, por otra, desarrollar nuevos envases alimentarios activos y/o inteligentes para reforzar aspectos como el control de la proliferación de microorganismos, ayudando de esta forma a mejorar la calidad del alimento y alargar su vida útil (Figura 3) (Rhim *et al.*, 2013).



Figura 3. Ventajas de la incorporación de nanopartículas en el desarrollo de envases alimentarios basados en biopolímeros.

El empleo de nanopartículas de plata (AgNPs) para el desarrollo de envases activos, con propiedades antimicrobianas que alarguen la vida útil del alimento, es una realidad hoy en día. De hecho, algunos de estos envases ya se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo “FresherLonger™ Miracle Food Storage Containers” y “FresherLonger™ Plastic Storage Bags” de Sharper Image (USA), “Nano-silver Food Containers” de A-DO Korea, y “Nano Silver Baby Milk Bottle” de BabyDream Co. Ltd. (Corea del Sur).

Las AgNPs también se han incorporado a materiales biopoliméricos. De hecho, se ha descrito un material biopolimérico de celulosa en el que se adicionan las AgNPs con la finalidad de extender la vida útil de productos vegetales como el repollo y los tomates. Con este material se ha conseguido preservar los valores nutricionales de los productos empaquetados, además de mantener unos niveles de humedad constante que proporcionan a los vegetales un aspecto más fresco durante más tiempo. Adicionalmente, el material presenta propiedades antimicrobianas frente a *Aeromonas hydrophila*, una bacteria Gram negativa capaz de contaminar diferentes tipos de alimentos en cámaras frigoríficas (Singh & Sahareen, 2017a). En esta misma línea, se ha descrito otro material polimérico, pero en este caso sintético, basado en el ácido poliláctico (PLA), en el que se incorporan AgNPs con el objetivo de mejorar su estabilidad mecánica y térmica, así como sus propiedades antimicrobianas (Li *et al.*, 2017).

Analogamente, se han propuesto diferentes materiales basados en el biopolímero quitosano en el que se incorporan TiO₂NPs por sus propiedades antimicrobianas y bloqueantes de la radiación ultravioleta. La inclusión de estas nanopartículas mejoró notablemente las características mecánicas y antimicrobianas del material (Hernández-Muñoz *et al.*, 2006; Friedman & Juneja, 2010; Youssef *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017b). Asimismo, el empleo de TiO₂NPs en materiales bicapa, constituidos por celulosa y PLA disminuye la permeabilidad de los biopolímeros a los gases y mejora su transparencia óptica (Roilo *et al.*, 2017). Por otro lado, la incorporación de TiO₂NPs a biopolímeros de origen vegetal, como la soja, ha permitido obtener un envase alimentario transparente, soluble en agua y con propiedades mecánicas y antimicrobianas mejoradas (Salarbashi *et al.*, 2018).

Al igual que las TiO₂NPs, las ZnONPs se han empleado en materiales con uso alimentario por su capacidad antimicrobiana y bloqueante de la radiación ultravioleta. Por ejemplo, se han incorporado a un material biopolimérico basado en PLA para evitar contaminaciones microbianas en los alimentos. El material activo resultante mostró propiedades antimicrobianas frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, dos bacterias patógenas presentes en el ámbito alimentario (Zhang *et al.*, 2017a). Estas nanopartículas se han incorporado también a materiales biodegradables procedentes de la sémola, un tipo de harina de maíz con alto contenido en gluten y con elevada actividad antioxidante. La presencia de las ZnONPs mejoró las propiedades barrera del biomaterial. Además, la incorporación de estas partículas inhibió el crecimiento de *E. coli* (Jafarzadeh *et al.*, 2017). Asimismo, la inclusión de ZnONPs en un material biopolimérico obtenido a partir de polisacáridos extraídos de diferentes especies de algas marinas, otorgó al material capacidad antimicrobiana frente a este mismo patógeno (Oun *et al.*, 2017). En la actualidad los envases alimentarios que utilizan las ZnONPs se encuentran disponibles en el mercado asiático, como es el caso del denominado material Nano Plastic Wrap comercializado por la compañía Song Sing Nano Technology Co. Ltd.

1.3. Nanopartículas como plataformas sensoras para el control de calidad de los alimentos.

En la industria alimentaria es crucial garantizar la seguridad en todo el proceso, desde la producción del alimento hasta su llegada al consumidor. Sin embargo, la contaminación de los alimentos puede originarse en cualquier etapa de su cadena de producción, así como durante su almacenamiento y distribución. Esto implica la necesidad de disponer de herramientas adecuadas que posibiliten una detección rápida y fiable de

posibles patógenos, así como una detección temprana del propio deterioro de los alimentos. En este sentido, la combinación de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos con plataformas sensoras ha permitido desarrollar nanosensores que proporcionan información sobre parámetros de calidad de los alimentos, al mismo tiempo que contribuyen a mejorar la seguridad de los mismos. Los nanosensores son capaces de interactuar con los factores internos del alimento, o con los externos ambientales, generando una respuesta en tiempo real relacionada con el estado del producto y del entorno que le rodea. Además, estos dispositivos pueden incorporarse a los envases alimentarios dando lugar a lo que se conoce como envases inteligentes, siendo capaces de monitorizar en tiempo real el estado de los alimentos y de su entorno, y también de realizar las funciones propias de un material destinado a estar en contacto con alimentos (Figura 4) (Fuertes *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

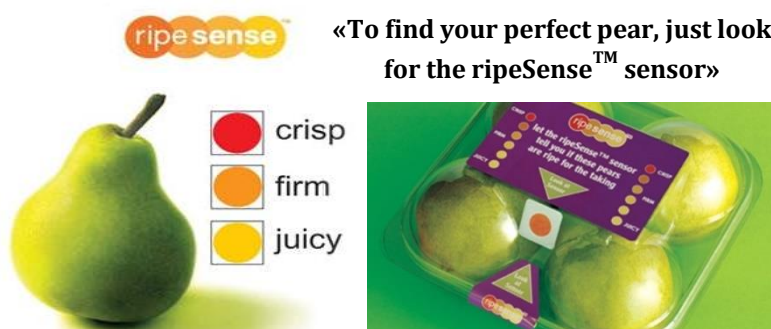


Figure 4. Ejemplo de envase inteligente que indica el grado de madurez de una fruta. Adaptación de la revista online NEW ATLAS (Hanlon, 2005).

En este sentido, han aparecido muchos estudios relacionados con la incorporación de nanopartículas de oro (AuNPs) para el desarrollo de envases inteligentes. Por ejemplo, estas partículas se han propuesto para el desarrollo de nanosensores que detecten selectivamente *Listeria monocytogenes*, uno de los microorganismos que produce una de las infecciones alimentarias con mayor tasa de mortalidad (Du *et al.*, 2018). Por otro lado, las AuNPs se han utilizado en sensores para controlar la temperatura del alimento durante su fase de almacenamiento y distribución (Lim *et al.*, 2012).

En referencia a las nanopartículas de óxidos metálicos, las ZnONPs se han empleado para desarrollar un biosensor para la detección de ocratoxina A (OTA). En este caso las partículas actuaron como soporte para la inmovilización de biomoléculas como anticuerpos (inmunoglobulinas) y proteínas (albúmina de suero bovino), ambas necesarias para la detección de esta micotoxina. La OTA es una micotoxina producida por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, clasificada como contaminante natural de cereales y derivados, legumbres, bebidas alcohólicas como el vino, y productos de molienda como el café y el cacao. Su aparición se origina principalmente por

contaminaciones primarias a través de mohos de muchos productos vegetales, como granos de cereal y, suele estar relacionada con las condiciones de producción y conservación del alimento. Esta micotoxina tiene actividad nefrotóxica, inmunopresora, genotóxica, carcinogénica, teratogénica y neurotóxica por lo que supone una grave amenaza para la seguridad alimentaria. La incorporación de ZnONPs, no solo proporciona el sustrato necesario para la adhesión de las biomoléculas anteriormente mencionadas, sino que también permite amplificar la señal electroquímica de este nanosensor (Ansari *et al.*, 2010). Analogamente, estas nanopartículas se han empleado para el desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección de lactato, aditivo utilizado para extender la vida útil de los alimentos, y que a niveles elevados, ocasiona efectos adversos en niños menores de tres años (Nesakumar *et al.*, 2014).

2. Procesos regulados por *quorum sensing* (QS). Formación de biopelículas en la industria alimentaria.

Como se ha comentado anteriormente, una de las propiedades más importantes de las nanopartículas objeto de estudio es su capacidad antimicrobiana. La formación de biopelículas bacterianas es uno de los problemas de la industria alimentaria cuya presencia puede comprometer la seguridad del consumidor. La formación de estas biopelículas está regulado por un proceso de comunicación bacteriano denominado *quorum sensing* (QS). Existen estudios que indican que las nanopartículas pueden afectar este proceso de comunicación, y en consecuencia alterar y/o inhibir la formación de estas biopelículas. Debido a la profundidad con la que se ha tratado la interacción entre las nanopartículas y las biopelícula bacterianas en la presente Tesis Doctoral, se ha considerado adecuado tratar esta temática en un apartado diferente al anterior.

2.1 *Quorum sensing*: sistemas de comunicación bacteriana.

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas basadas en metales y metaloides ha suscitado el interés en investigar la interacción de las nanopartículas con las poblaciones bacterianas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no se ha abordado el efecto de las mismas sobre los comportamientos cooperativos que se dan entre microorganismos, los cuales son esenciales para la supervivencia de las diferentes especies bacterianas.

En un primer momento se consideró que en las poblaciones de bacterias no existían mecanismos de comunicación intercelular, a diferencia de lo que ocurre en los organismos superiores en los que sí se habían descrito, por ejemplo, durante el

crecimiento del cigoto y en la formación de los tejidos y en el desarrollo de cada una de sus funciones (Marquina & Santos, 2010a). Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que las bacterias desarrollan comportamientos cooperativos gracias a sofisticados mecanismos de comunicación intercelular, a través de los cuales son capaces de producir y responder a señales extracelulares producidas por bacterias de la misma o de diferente población (Marquina & Santos, 2010a).

Esta capacidad para desarrollar un comportamiento social coordinado es debida a los denominados procesos de *quorum sensing* (QS), también conocidos como percepción de *quorum*, que han sido definidos como una modalidad de comunicación intercelular bacteriano que controla la expresión génica en función de la densidad celular, usando pequeñas moléculas de señalización química denominadas autoinductores. De esta manera, densidades celulares bajas hacen que la concentración del autoinductor en el medio sea muy reducida y que, por tanto, no se produzca la activación de los sistemas dependientes del *quorum sensing*. Sin embargo, a medida que crece la población bacteriana, se incrementa el nivel extracelular de la molécula señal hasta alcanzar una concentración umbral que desencadena una variación de la expresión génica (Turan *et al.*, 2017). Los procesos fisiológicos regulados por QS son muy diversos y pueden clasificarse en cuatro categorías funcionales: 1) mantenimiento y proliferación celular (producción de exoenzimas, esporulación, síntesis de metabolitos secundarios, pigmentación, etc.) 2) comportamiento celular (formación y dispersión de biopelículas, motilidad, adhesión, etc.); 3) transferencia génica horizontal (conjugación de plásmidos, competencia) e 4) interacciones con el huésped y otros microbios (factores de virulencia, producción de exopolisacáridos, producción de bioluminiscencia, antibióticos o factores de colonización de huéspedes) (Grandclement *et al.*, 2016). Como se puede deducir de esto, las moléculas de señalización química o autoinductores tienen un papel clave en los procesos de comunicación bacteriana. Hasta la fecha se han descrito numerosas moléculas que pueden actuar como autoinductores, siendo los oligopéptidos en bacterias Gram positivas y las N-acil homoserina lactonas (AHL) en bacterias Gram negativas los dos grupos principales. También se ha descrito un tercer grupo de moléculas de señalización utilizado tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas, denominado autoinductor 2 (AI-2), el cual parece estar involucrado en la comunicación bacteriana inter-especie (Turan *et al.*, 2017). En la Figura 5 se muestran los tres tipos. Además, dependiendo del número de autoinductores involucrados en los procesos de QS se puede diferenciar entre sistemas sencillos, regulados por una única molécula autoinductora; y los sistemas complejos donde

existen más de un autoinductor con una composición química que puede ser heterogénea.

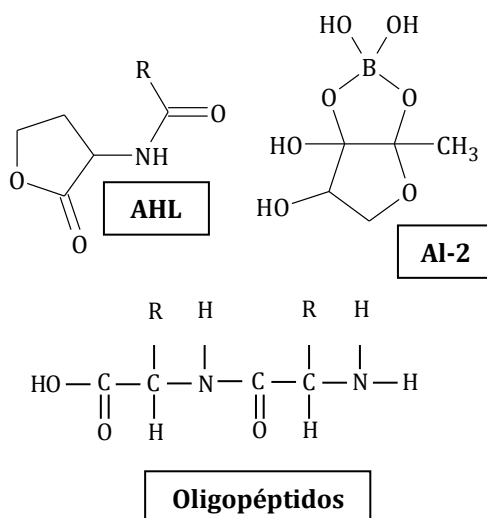


Figura 5. Estructura química general de las moléculas de señalización en los procesos de QS (Turan et al., 2017).

A nivel molecular, los sistemas de QS se componen generalmente de dos genes: un gen codificador de la enzima sintasa que sintetiza las moléculas señal; y otro gen regulador transcripcional que actúa como receptor de las moléculas y como regulador de la expresión génica.

En el caso de las bacterias Gram negativas, alrededor de 25 géneros como *Rhizobium*, *Pseudomonas* o *Vibrio*, entre otras, emplean autoinductores del grupo AHL para la regulación de los sistemas QS. Este sistema en concreto está regulado por el operón LuxI/LuxR, que de forma constitutiva expresa niveles basales de la proteína LuxI, la cual es la responsable de la síntesis del autoinductor en el interior de la célula, siendo este secretado al medio celular o extracelular. Cuando la concentración del autoinductor está por encima del nivel umbral, este vuelve al interior celular donde va a ser reconocido por la proteína receptora LuxR activando la transcripción de determinados genes diana involucrados en los diferentes procesos fisiológicos regulados por QS (Figura 6a). Por lo general, todas las moléculas que pertenecen al grupo de las AHL tienen una estructura química muy similar, un ácido graso o grupo acilo (parte hidrofóbica) cuya cadena hidrocarbonada puede variar entre 4 y 18 átomos de carbono. Este grupo acilo está unido por un enlace amida a una homoserina lactona (anillo lactónico). A parte de la longitud del grupo acilo, también se pueden diferenciar en la sustitución del tercer carbono de este mismo grupo en el que puede haber un grupo oxo o un grupo hidroxilo (Figura 5). La naturaleza de la estructura del ácido graso determina la especificidad para ser reconocido (Fuqua et al., 2002).

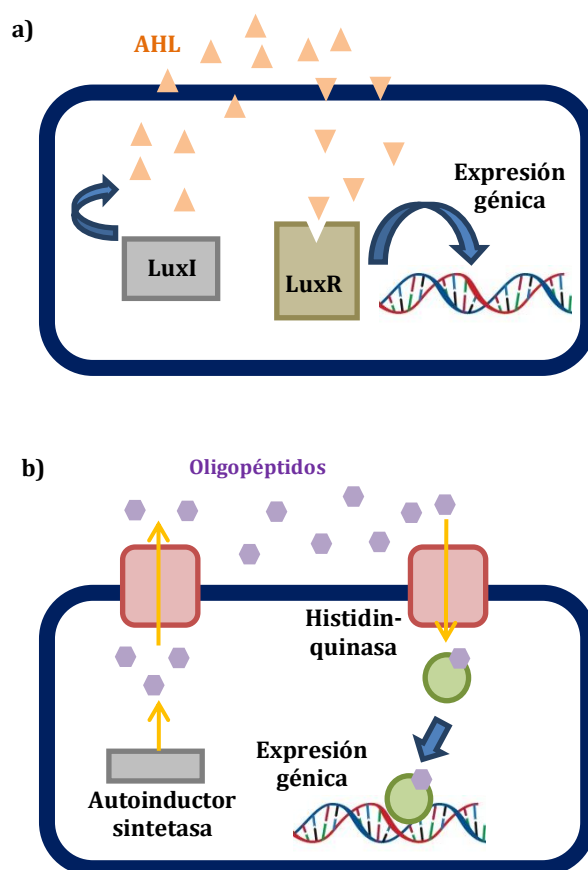


Figura 6. Esquema general del mecanismo de los procesos de QS en bacterias Gram negativas (a) y Gram positivas (b).

Sin embargo, el mecanismo de los procesos de QS en bacterias Gram positivas es mucho más complejo que el descrito para bacterias Gram negativas (Figura 6b). En este caso, las moléculas responsables de la señalización química son oligopéptidos modificados de mayor especificidad que las AHL. Además estos autoinductores no difunden a través de la membrana plasmática, por lo que para ser excretados al medio extracelular necesitan un transportador específico. De la misma manera, una vez que se ha alcanzado el nivel umbral, los péptidos no regresan al interior de la célula sino que se unen a un receptor de membrana, histidín-quinasa, y la señal producida se transmite por una cascada de procesos de fosforilación /defosforilación. Finalmente, tras ser activado el regulador de la respuesta, se une al ADN modulando la transcripción del gen diana controlado por el sistema QS (Figura 6b) (Water y Bassler, 2005). El ejemplo más sencillo de estos sistemas de QS es el descrito para la bacteria *S. aureus*.

2.2 Inhibición de los sistemas QS.

Durante los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de agentes químicos que sean capaces de alterar los procesos de QS, debido principalmente a que estos sistemas de comunicación bacteriana juegan un papel crítico en la patogenicidad de

muchas especies de microorganismos. Por tanto, este tipo de estrategia se ha centrado fundamentalmente, en el desarrollo de una nueva generación de antibióticos que puedan atenuar la virulencia del patógeno en vez de producir la muerte celular del mismo, como ocurre con los antimicrobianos tradicionales, los cuales acaban generando cepas multirresistentes (Ilk *et al.*, 2017). De esta manera, si los procesos de comunicación microbiana son interrumpidos, los patógenos pierden capacidad de adaptarse al ambiente del huésped pudiendo ser eliminados por las defensas del mismo.

Por otro lado, conocer cómo afectan diferentes sustancias a los sistemas de QS puede suponer una vía muy útil para el estudio de los efectos que pueden tener nuevas sustancias, como por ejemplo los nanomateriales, sobre el medio ambiente. Esto tiene una gran importancia, ya que este tipo de comunicación permite a las poblaciones bacterianas desarrollar respuestas colectivas unificadas ante cambios en las condiciones ambientales (Whiteley *et al.*, 2017).

Los mecanismos mediante los cuales se puede llevar a cabo la interrupción de los sistemas QS se han denominado *quorum quenching* (QQ) y han sido estudiados sobre todo en bacterias Gram negativas (Waters & Bassler, 2005). Los procesos de QQ actúan bloqueando los pasos clave del QS tales como la generación, acumulación o recepción de la señal. En este sentido, se puede decir que existen principalmente tres estrategias para lograr este objetivo (Figura 7): 1) interrumpir la biosíntesis de la molécula señal AHL; 2) impedir la acumulación, intercambio y transporte de la señal AHL; y/o 3) alterar la percepción de la señal y su respuesta.

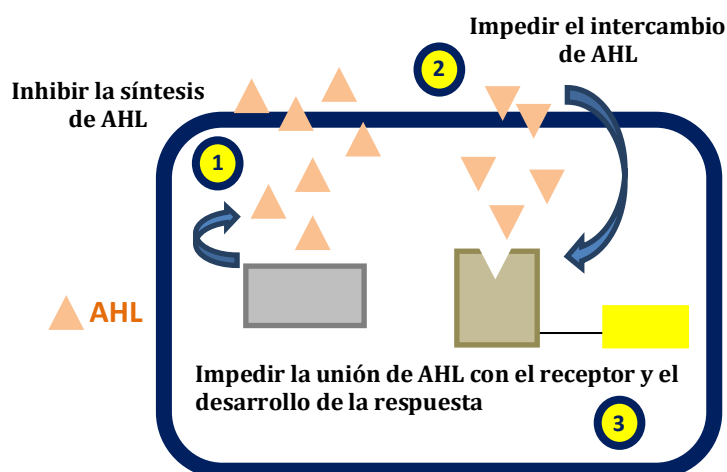


Figura 7. Principales estrategias para la inhibición de los sistemas de QS en bacterias Gram negativas. Adaptación de Grandclement *et al.* 2016

La naturaleza de las sustancias inhibidoras de los sistemas de QS es muy diversa. Por ejemplo, se han empleado varios tipos de enzimas para la degradación enzimática de las moléculas de AHL una vez que estas han sido producidas. Así las AHL-lactonasas, sintetizadas por algunos microorganismos, actúan sobre la molécula de AHL rompiendo el anillo lactónico de la homoserina lactona (Uroz *et al.*, 2008). Asimismo, las acilasas o amidasas actúan rompiendo el enlace amida entre AHL y el ácido graso, y las enzimas tipo citocromo oxidasas catalizan la oxidación del grupo acilo de la AHL (Lin *et al.*, 2003; Chowdhary *et al.*, 2007). Por otro lado, el empleo de compuestos químicos análogos estructuralmente a las AHL o de sustancias precursoras capaces de mimetizar estas moléculas señal y de unirse por competición a los sitios de unión de los receptores, también son muy comunes en los procesos de QQ (Dongn *et al.*, 2007).

Aunque algunos de los agentes químicos inhibidores de los sistemas QS son producidos por bacterias, hongos o invertebrados terrestres y marinos, la mayoría de ellos son extraídos de diferentes especies de plantas, desde vegetales comestibles hasta plantas medicinales, y de todo tipo de tejidos vegetales como raíces, flores, corteza, hoja, tallos, semillas y frutos (Alvarez *et al.*, 2012; Ilk *et al.*, 2017). Además cabe destacar que la mayoría de estas sustancias son compuestos cíclicos, tales como derivados fenólicos (flavonoides) o cíclicos de nitrógeno (Granclement *et al.*, 2016). Más recientemente, también se ha propuesto el uso de nanopartículas metálicas y óxidos metálicos como agentes inhibidores de QS (Wagh *et al.*, 2013; Arunkumar *et al.*, 2014; Naik *et al.*, 2014; Al-Shabib *et al.*, 2016; Prateeksha *et al.*, 2017; Samanta *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios relacionados con la capacidad *anti-quorum sensing* de estas especies químicas, y con los mecanismos por los cuales ejercen su actividad inhibidora, son todavía muy escasos.

Para determinar si un compuesto químico puede inhibir la comunicación bacteriana y ser, por tanto, un agente inhibidor de los sistemas de QS, se suelen emplear microorganismos llamados biosensores. Por lo general, es habitual la utilización de cepas bacterianas mutantes en las que el gen sintasa, responsable de la síntesis de la molécula señal, esté afectado, mientras que el gen regulador transcripcional esté intacto. De esta manera, las cepas mutantes no son capaces de producir la molécula señal, pero sí pueden detectar las producidas por otros microorganismos, o simplemente detectar aquellas que se encuentren en el medio extracelular. Además, al reconocer la molécula señal exógena generan una señal visible y fácilmente detectable como es el color o una bioluminiscencia. Sin embargo, no solamente se utilizan cepas mutantes, sino también cepas intactas en las que los procesos regulados por QS se ven afectados, ya sea por producción de color o de

biolumiscencia, cuando el agente inhibidor de QS esté presente en el medio extra/intracelular (Rai *et al.*, 2015).

Los microorganismos sensores más utilizados para la detección de moléculas AHLs son *Agrobacterium tumefaciens* y *Chromobacterium violaceum*. La cepa mutante biosensora *A. tumefaciens* NTL4 es capaz de detectar moléculas de AHL de cadena media (4-8 carbonos) y larga (más de 10 carbonos) produciendo color azul en presencia de AHLs exógenas (Morohoshi *et al.*, 2008). Por otro lado, *Chromobacterium violaceum* es una bacteria que se encuentra comúnmente en suelos y aguas, y es frecuentemente considerada como un patógeno oportunista. En esta bacteria la producción del pigmento morado, denominado violaceína, en presencia de AHLs están reguladas por QS. La facilidad con la que se puede cuantificar el aumento o la disminución de la producción de este pigmento en presencia de agentes inhibidores de sistemas de QS, hace que sea una de las metodologías más utilizadas para la búsqueda de nuevos compuestos químicos capaces de interferir en los sistemas de comunicación bacteriana. Las cepas ATCC 12472 y CV026 de *C. violaceum* son las más habituales en este tipo de estudios. Los genes sintetizadores y reguladores de AHLs en esta bacteria son *cvlI* y *cvlR*, respectivamente, y son homólogos de *LuxI* y *LuxR* descritos anteriormente para la regulación del QS en las bacterias Gram negativas. En el caso de la cepa mutante *C. violaceum* CV026, presenta una mutación en el gen *cvlI* que hace que no sea capaz de sintetizar AHLs, pero sí de producir violaceína en respuesta a una concentración específica de AHL exógena (Duran *et al.*, 2016).

Por último, también se ha recurrido a las técnicas cromatográficas (GC, LC, CE y TLC) acopladas a la espectrometría de masas para la detección y cuantificación de AHLs en diferentes tipos de muestras (Verbeke *et al.*, 2017).

2.3. Formación de biopelículas bacterianas en la industria alimentaria y en el sector clínico.

Los sistemas de QS controlan importantes funciones fisiológicas en numerosas poblaciones bacterianas, muchas de ellas relacionadas con la patogenicidad, entre las que se encuentran la formación de biopelículas o *biofilms*.

Las biopelículas microbianas pueden definirse como una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y que se encuentra adherida a una superficie inerte o a un tejido vivo. Las poblaciones bacterianas que crecen en forma de biopelícula cambian su fenotipo con respecto a las mismas células en forma unicelular o libre (forma planctónica), lo que implica diferencias

en la expresión de genes específicos y alteraciones en su morfología, y en la tasa de crecimiento. El crecimiento en forma de *biofilm* protege a los microorganismos de la acción de agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento y posibilita la transferencia de material genético (Costerton, 1999; Marquina & Santos, 2010b). La formación del biofilm es un proceso complejo que se desarrolla principalmente en cinco etapas (Figura 8) (Marquina & Santos, 2010b; Jamal *et al.*, 2018):

1) Adhesión a la superficie

La primera etapa del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia de células sobre una superficie utilizando diferentes estrategias de unión. En el caso de bacterias Gram negativas, el empleo de estructuras filamentosas localizadas en la superficie celular como fimbrias y flagelos facilita enormemente la adhesión inicial a los sustratos, aunque no son fundamentales para conseguir dicha unión. Sin embargo, en el caso de bacterias Gram positivas, los procesos de adhesión suelen llevarse a cabo por proteínas de superficie. Esta primera etapa de adhesión de la bacteria a la superficie es reversible y la unión bacteria-superficie está mediada por fuerzas de *Van der Waals*, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Además, suele ser un proceso rápido, principalmente influenciado por la disponibilidad de nutrientes y la temperatura.

2) División celular y formación de colonias

Tras el proceso de adhesión reversible, las células bacterianas comienzan a dividirse hasta formar microcolonias. Al aumentar la densidad de población bacteriana, la concentración de moléculas autoinductoras liberadas al medio extracelular se va incrementando hasta alcanzar el nivel umbral a partir del cual se establece la regulación de la formación del biofilm mediante *quorum sensing*.

3) Secreción de sustancias poliméricas extracelulares

Uno de los procesos regulados por *quorum sensing* en la formación de la biopelícula es la generación de la matriz, la cual está involucrada en la retención de los nutrientes y en la protección de las células de los cambios del ambiente y del ataque de predadores y biocidas. Una vez alcanzada la concentración umbral de las señales autoinductoras, las células que forman el biofilm comienzan a secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que constituyen el componente principal de la matriz de la biopelícula, junto con el agua. No se sabe con exactitud la composición de la matriz del exopolímero, aunque sí se conoce que, de manera general, las sustancias que la componen suelen ser polisacáridos extracelulares, proteínas y ácidos nucleicos. La composición del

exopolisacárido es diferente según el tipo de microorganismo. Por ejemplo, *P. aeruginosa* produce mayoritariamente alginato, mientras que *S.aureus* genera poli-N-acetil-glucosamida. Sin embargo, también se ha descrito que una misma bacteria puede producir distintos tipos de exopolisacáridos, como ocurre, por ejemplo, con algunas cepas de *P.aeruginosa* que son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa. Una vez que se ha formado la matriz de la biopelícula, la adhesión con la superficie se vuelve irreversible.

4) Maduración de la biopelícula y formación de canales

La maduración de la biopelícula hace referencia al crecimiento tridimensional y la consolidación de una estructura en una simple capa de bacterias o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares. Además, en dicha estructura se produce la diferenciación celular de la zona basal y la apical. Mientras que las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en las capas superficiales, las células inferiores mueren por la falta de oxígeno y nutrientes generando en muchos casos la lisis celular, lo que da lugar a la creación de canales. Estos canales permiten la recirculación del medio de cultivo y, por tanto, la aportación de nutrientes, sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos a todas sus capas celulares.

5) Dispersión de células colonizadoras

Finalmente, se produce la diferenciación de la zona apical de la biopelícula y el desprendimiento de las células presentes en esa área de la matriz de exopolímeros, para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso.



Figura 8. Etapas en el desarrollo de un biofilm bacteriano.

El desarrollo de las biopelículas bacterianas está influenciado por varios factores como son: las propiedades de las superficies de contacto, temperatura, composición y propiedades de la comunidad microbiana, y la disponibilidad de nutrientes y de agua (Garret *et al.*, 2008).

El crecimiento de biopelículas bacterianas puede originarse en muchos ámbitos industriales y domésticos. La presencia de estas biopelículas tiene un impacto negativo tanto por los graves problemas de salud que pueden ocasionar, como por las pérdidas económicas resultantes de la contaminación de productos finales, del deterioro de los equipos y de los procesos aplicados para el control y eliminación de estas biopelículas. Todos estos efectos negativos son de especial relevancia en el ámbito de la industria alimentaria.

La presencia de biopelículas en superficies en contacto con alimentos es la causa principal de la contaminación del producto principal y, por tanto, un problema de seguridad alimentaria. Además, las biopelículas microbianas también pueden estar presentes tanto en los equipos de procesamiento de alimentos y sus accesorios, como en el entorno y equipamiento del operario que manipula los productos, y también en superficies abiertas como suelos, paredes, techos, puertas, desagües o cintas transportadoras (Sofos & Geornara, 2010). Aunque son muy numerosas las bacterias que pueden formar biopelículas en el ámbito de la producción de alimentos, bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* o *Bacillus cereus* adquieren especial relevancia cuando se habla de un problema de seguridad alimentaria (Cappitelli *et al.*, 2014).

La especie bacteriana Gram negativa *Escherichia coli* es una de las bacterias predominantes en la microbiota del hombre y de la mayor parte de los animales. A pesar de ser el microorganismo facultativo mayoritario, solo supone un bajo porcentaje del contenido total de bacterias en el tracto gastro-intestinal. Esta cepa bacteriana se emplea frecuentemente como indicador de contaminación, dado que puede sobrevivir varios días en el agua y los alimentos, y al ser excretada por las heces se puede detectar fácilmente. Aunque la mayoría de cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas, algunas de ellas adquieren factores de virulencia pudiendo producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, etc.) o extraintestinales (infecciones urinarias, septicemias, meningitis, mastitis, infecciones pulmonares, etc.) (Blanco *et al.*, 2002; Aijuka & Buys, 2019). La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos de enfermedades procede de la expresión de múltiples factores de virulencia que contribuyen

a la formación de biopelículas. *E. coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión a la superficie. En una etapa posterior, pierde los flagelos y comienza a secretar las sustancias poliméricas extracelulares en las que polisacáridos, como la celulosa, el ácido colánico y la poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina, refuerzan la adhesión entre células y a la superficie, y estabilizan la estructura de la biopelícula (Beloin *et al.*, 2008).

Otro género de bacterias Gram negativas que se encuentran en el ambiente alimentario es el género *Pseudomonas*. En concreto, la especie *Pseudomonas aeruginosa* puede estar presente en desagües, suelos, verduras o superficie de corte y de contacto de las carnes. Asimismo, esta especie bacteriana está involucrada en numerosas infecciones nosocomiales (aquellas que aparecen durante la estancia hospitalaria), por lo que también supone un problema grave en ambientes hospitalarios. Por ejemplo, *P. aeruginosa* puede colonizar casi todas las partes del cuerpo, aunque su localización más frecuente son las vías respiratorias de los humanos. Asimismo, también puede colonizar superficies inertes como material quirúrgico, implantes médicos, catéteres, válvulas cardíacas, prótesis, etc. Como consecuencia de esto, puede causar diferentes cuadros clínicos, siendo los más frecuentes las infecciones del tracto respiratorio en forma de neumonía e infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística, con alteración de la estructura bronquial o pulmonar y en pacientes inmunosuprimidos (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Los procesos patológicos asociados a la infección por *P.aeruginosa* son debidos al gran número de factores de virulencia que también contribuyen a la formación de biopelículas. Además, esta especie ha sido ampliamente utilizada como modelo bacteriano en estudios de formación de biopelículas y regulación mediante *quorum sensing*. Del mismo modo que en el caso de *E. coli*, *P.aeruginosa* utiliza apéndices estructurales como flagelos, fimbrias y pili para la adhesión a las superficies. Asimismo, también se ha descrito que los polisacáridos mayoritarios presentes en la matriz de la biopelícula formada por esta especie bacteriana son alginato, Psl y Pel (Wei & Ma, 2013).

Otro de los patógenos alimentarios más importantes son las bacterias del género *Staphylococcus*, ya que pueden encontrarse tanto en los alimentos crudos como en los equipos de procesado y en el personal que manipula los alimentos. De manera específica, el coco Gram positivo *Staphylococcus aureus* forma parte de la microbiota habitual del hombre, pudiéndose encontrar en la piel y en las mucosas. Esta bacteria también es responsable de muchas de las infecciones nosocomiales que se originan en el entorno hospitalario (Lister & Horswill, 2014). De esta manera, *S. aureus* es el causante de diversos procesos infecciosos, desde intoxicaciones alimentarias a infecciones de la piel,

neumonías, meningitis, desórdenes autoinmunes e infecciones sistémicas. Al igual que en los casos anteriores, *S. aureus* también es capaz de formar biopelículas en numerosas superficies, siendo el componente mayoritario de la matriz el polisacárido N-acetilglucosamida (Walker & Horswill, 2012; Lister & Horswill, 2014).

La formación de biopelículas tanto en el área de la industria alimentaria como en el entorno hospitalario supone un gran problema de salud pública, ya que el desarrollo de biopelículas por diversos patógenos está relacionado con infecciones crónicas y otro tipo de patologías difíciles de tratar. Además, las infecciones por biopelículas microbianas no suelen erradicarse completamente, debido a la ineficacia de la terapia antimicrobiana, por lo que es muy común que se produzcan episodios recurrentes (Hoiby *et al.*, 201). Esto ha hecho que se hayan desarrollado nuevas estrategias para el control y la eliminación de las biopelículas microbianas. La mayoría de estas estrategias tienen por objeto: impedir la adhesión inicial de los microorganismos a las superficies, inhibir la biosíntesis de polisacáridos y proteínas de la matriz, alterar la estructura de la biopelícula para facilitar la penetración de los agentes antimicrobianos, o inducir la dispersión de los biofilms ya formados (Hori & Matsumoto, 2010; Sharahi *et al.* 2019). Más recientemente también se han diseñado estrategias basadas en la interrupción de los procesos de *quorum sensing* responsables de regular la formación de las biopelículas microbianas (Njoroge & Sperandio, 2009; Roy *et al.*, 2018). En este sentido, las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos cada vez cobran más protagonismo en los estudios que tienen por objetivo inhibir la formación de biopelículas microbianas o de eliminar los biofilms una vez que se han establecido en las superficies (Singh *et al.*, 2016; Zazo *et al.*, 2016).

2.4. Interacción de nanopartículas con poblaciones bacterianas. Mecanismos de acción.

La actividad biocida de las nanopartículas depende de propiedades como el tamaño, morfología, estado de agregación, estructura cristalina o carga superficial de las nanopartículas, y también de las características de las poblaciones bacterianas. Por ejemplo, se ha demostrado que las nanopartículas de menor tamaño tienen un efecto bactericida más pronunciado, debido principalmente a que pueden atravesar con mayor facilidad la pared bacteriana (Khezerlou *et al.*, 2018). Asimismo, partículas cuya carga superficial es positiva pueden unirse de manera más sencilla a bacterias con carga superficial negativa, lo que favorece la interacción nanopartícula-bacteria y, por tanto, la acción antimicrobiana (Seil & Webster, 2012). Además, la agregación de las nanopartículas

puede dificultar su transporte a través de la pared bacteriana (Moritz & Geszke-Moritz, 2013).

Por otro lado, las características de las comunidades bacterianas también influyen en la interacción de las nanopartículas con estas y, por ende, en sus propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, las bacterias Gram negativas y Gram positivas difieren en su sensibilidad hacia las nanopartículas, debido principalmente a la composición química de las paredes celulares, provocando un mayor efecto en las bacterias Gram negativas. Aunque depende enormemente de su recubrimiento, las nanopartículas suelen estar cargadas positivamente por lo que la interacción electrostática es más fuerte con bacterias Gram negativas, las cuales tienen una mayor carga negativa en la superficie que las bacterias Gram positivas. Otro de los factores que influyen en la tolerancia de las poblaciones bacterianas hacia las nanopartículas es la tasa y la forma de crecimiento bacteriano. En este sentido, las bacterias de crecimiento rápido son más susceptibles que las bacterias de crecimiento lento. Asimismo, las bacterias que crecen en forma de biopelícula son mucho más resistentes a la acción de los agentes antimicrobianos que aquellas que lo hacen en modo planctónico (Hajipour *et al.*, 2010).

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo involucrado en la actividad antimicrobiana de las nanopartículas, se han propuesto diferentes modos de acción (Figura 9): daños en la pared celular por interacción electrostática, inducción de estrés oxidativo por la formación de especies reactivas de oxígeno, liberación de iones metálicos, disfunción de proteínas y enzimas, inhibición de la señal de transducción, y/o genotoxicidad (Raghunath & Perumal, 2017).

Las diferencias entre las cargas superficiales de las nanopartículas y de la pared bacteriana hacen que exista atracción electrostática entre ambas dando lugar a la acumulación de las partículas en las superficies bacterianas, alterando la estructura y permeabilidad de la membrana bacteriana lo que provoca la liberación del contenido celular (lipopolisacáridos, proteínas de membrana y otros componentes intracelulares). Además, la unión de las nanopartículas a mesosomas (replegamiento interno de la membrana celular) puede alterar la respiración y división celular, y la replicación del ADN.

Una vez que las nanopartículas han pasado al interior de la célula bacteriana pueden inducir la generación de especies reactivas de oxígeno, debido a procesos de oxidación-reducción, a los grupos funcionales reactivos en la superficie de las partículas y a la interacción entre los componentes de la célula y estas partículas. Esto puede alterar la

respiración celular, puede causar cambios morfológicos en la pared bacteriana, o producir daños en el ADN y en otras biomoléculas como proteínas y lípidos.

Por otro lado, la liberación de iones metálicos por disolución de las nanopartículas puede originar variaciones en el balance de elementos en el interior celular, lo que es de vital importancia para la supervivencia microbiana, al estar implicados en la regulación de diversas funciones metabólicas por medio de coenzimas, cofactores y catalizadores.

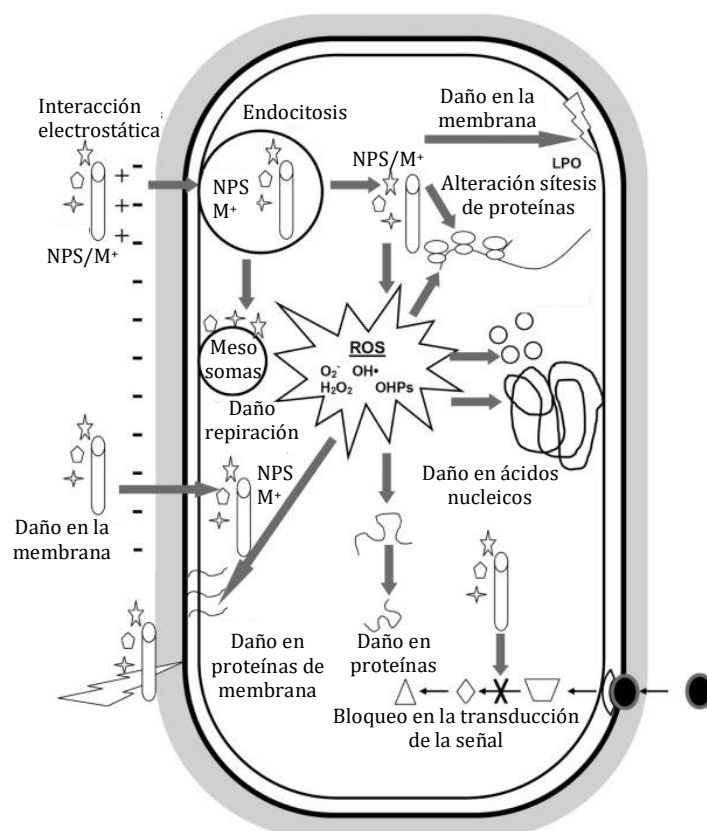


Figura 9. Mecanismos propuestos involucrados en la acción antimicrobiana de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos. Adaptación de Raghunath & Perumal, 2017.

De manera más específica, en la Tabla 2 se recogen los mecanismos asociados a la actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas y de metaloides de mayor relevancia.

Como ya se ha comentado, la forma de crecimiento de las poblaciones bacterianas, ya sea en forma de biopelícula o en plactónico, también influyen en la interacción e impacto biológico de las nanopartículas en las comunidades bacterianas. En este sentido, se conoce que las bacterias asociadas a biopelículas pueden resistir a los agentes antimicrobianos por mecanismos adicionales diferentes a los de las bacterias planctónicas. Además, también se ha descrito el gran potencial del empleo de las nanopartículas para

combatir biopelículas formadas por numerosos patógenos aunque, al igual que pasaba con las poblaciones planctónicas, el modo de acción todavía se desconoce.

Tabla 2. Mecanismo antimicrobiano propuesto para nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos y metaloides.

NPs	Mecanismos antimicrobiano propuesto	Referencia
AgNPs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Interacción y acumulación de las NPs en la pared bacteriana. Cambio en la permeabilidad y daño en la estructura de la membrana. 2. Oxidación de Ag (0) a Ag⁺ y liberación de Ag⁺ que produce la generación de ROS. Alteración del ADN (pérdida de la capacidad de replicación), de la respiración celular y de la función normal de enzimas y, por tanto, del metabolismo celular. 3. Alta afinidad de Ag⁺ y AgNPs por componentes subcelulares que contribuye al daño de otros orgánulos como mitocondrias, ribosomas, citoesqueleto, etc. 	Zheng <i>et al.</i> 2018
ZnONPs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Generación de ROS en la superficie de la partícula que puede aumentar cuando se ilumina con UV. 2. Liberación de Zn²⁺. 3. Fuerte interacción electrostática con la superficie bacteriana, acumulación en la membrana plasmática, cambios en la morfología y en la permeabilidad. 4. Perturbación de la membrana y salida de fluidos y componentes intracelulares. Muerte celular. 5. Internalización. Acumulación en el citoplasma. 	Kumar <i>et al.</i> 2017
TiO ₂ NPs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Capacidad antimicrobiana en función de la estructura cristalina. 2. Efecto antimicrobiano reducido en oscuridad. 3. Generación de ROS tras irradiar TiO₂NPs con luz UV. ROS producen la degradación oxidativa de los lípidos (peroxidación lipídica) y de otros componentes de la membrana bacteriana. 	Häffner <i>et al.</i> 2017
SeNPs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Interacción con la superficie bacteriana y acumulación. 2. Liberación de selenio iónico lo que causa estrés oxidativo por generación de ROS. 3. Inhibición de la síntesis de proteínas. 4. Alteración del ADN. 	Skalickova <i>et al.</i> 2017
TeNPs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sustitución de los grupos sulfuro de los aminoácidos y, por tanto, alteración de las proteínas. 2. Oxidación de las reservas de glutatión. Generación de ROS y alteración de los procesos metabólicos. 	Shakibaie <i>et al.</i> 2017

El mecanismo a través del cual se produce la interacción entre las nanopartículas y las biopelículas microbianas puede describirse en tres pasos: 1) transporte de las nanopartículas a las proximidades de la biopelícula, 2) adhesión a la superficie de la biopelícula, y 3) migración dentro de la biopelícula. En estas dos últimas etapas, las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que sustentan la matriz de la biopelícula, juegan un papel primordial (Ikuma *et al.*, 2015). Una vez que la nanopartículas alcanza la matriz de la biopelícula, el comportamiento de las mismas en el interior del biofilm no está completamente esclarecido. Algunos autores, han descrito la agregación de las partículas

en su interior, mientras que otros han concluido que las nanopartículas permanecen dispersas, puesto que ciertos componentes de las EPS estabilizan las nanopartículas evitando la agregación. Asimismo, también se ha descrito la posible disolución de las nanopartículas al entrar en contacto con enzimas y otros compuestos orgánicos que aceleran la liberación de iones metálicos (Ikuma *et al.*, 2015). Tras el contacto de las nanopartículas con las células bacterianas embebidas en la matriz de EPS, puede darse cualquiera de los mecanismos antimicrobianos que se han detallado anteriormente, y que se especificaron en la Tabla 2, para los distintos tipos de nanopartículas.

Finalmente, cabe destacar que el proceso de interacción entre las nanopartículas y las biopelículas bacterianas está enormemente influenciado por las características físico-químicas de las partículas y de la matriz biológica de la biopelícula, así como de los parámetros ambientales en los que se desarrolle la interacción como, por ejemplo, el tipo y la composición de las superficies, la temperatura y el pH, entre otros (Ikuma *et al.*, 2015).

3. Riesgos asociados a la exposición a los nanomateriales. Marco legislativo para su regulación en el campo de la alimentación.

La aplicación de la nanotecnología en el sector alimentario se espera que continúe creciendo. Desafortunadamente, el desarrollo de la nanotecnología no ha ido acompañado de datos que informen sobre el impacto que la exposición a estos nanomateriales tiene sobre la salud del consumidor. Todo ello ha suscitado la necesidad de desarrollar un marco legislativo que aborde la regulación de estas nuevas sustancias químicas en el campo de la alimentación.

3.1. Rutas de exposición a los nanomateriales empleados en la industria alimentaria.

Las vías más probables de exposición a nanopartículas como consecuencia de su uso en la industria alimentaria son debidas a su adición directa a los alimentos en forma de aditivos, o a su presencia indirecta como resultado de un proceso de migración desde el envase alimentario que las contiene al alimento.

Como se ha descrito en el apartado 1.2, la adición de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos a materiales con uso alimentario mejora las propiedades antimicrobianas, de barrera y mecánicas de los mismos. Sin embargo, la aplicación de estas nanopartículas también puede conllevar riesgos, sobre todo como consecuencia de la posible migración de las nanopartículas desde el envase al alimento. Por tanto, resulta esencial realizar estudios sobre la posible migración de las nanopartículas una vez

desarrollado el material. Además, la migración de los compuestos desde el envase alimentario puede también alterar las características organolépticas del producto envasado.

La migración de los componentes de un envase al producto envasado es un proceso submicroscópico de transferencia de masa, consecuencia de la tendencia al equilibrio de todo sistema químico. Es por ello que está condicionado por diferentes factores, como las propiedades físico-químicas de la sustancia que migra, del material del envase, del alimento envasado, la estructura molecular del polímero, el tamaño del envase en proporción al volumen del producto empaquetado y las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento. El proceso de migración suele darse en varias etapas: 1) difusión del compuesto que migra a través del material polimérico; 2) desorción desde la superficie del polímero; 3) migración del compuesto al alimento hasta alcanzar una concentración de equilibrio; y 4) una vez disuelto el migrante en el alimento, difusión a través de este (Khajavi *et al.* 2019).

El Reglamento (UE) N° 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos indica que una estimación adecuada de las cantidades de componentes que migran desde el envase al alimento, requiere la aplicación de ensayos que simulen esta posible transferencia. Estos ensayos se realizan empleando simulantes alimentarios, sustancias con una composición química y propiedades físicas similares al producto contenido en el envase. Los simulantes alimentarios establecidos por la normativa para realizar los ensayos de migración son los siguientes: etanol 10 % (v/v), ácido acético 3 % (w/v), etanol 20 % (v/v), etanol 50 % (v/v), aceite vegetal y poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno). Los tres primeros se utilizan para simular alimentos que tienen carácter hidrofílico; los dos siguientes para alimentos de carácter lipofílico; y el último es específico para estimar la migración en alimentos secos (EU, 2011b).

La mayoría de los estudios de migración llevados a cabo en envases que incorporan nanopartículas utilizan los simulantes alimentarios anteriormente descritos. Así, el ácido acético al 3 % y el etanol al 50 % (Chegoyen & Nerin, 2013; Artiaga *et al.* 2015; Li *et al.*, 2017; Stormer *et al.*, 2017) se han empleado como simulantes para ensayos de migración de TiO₂NPs desde PLA, y de AgNPs desde envases comerciales de polipropileno y polietileno de baja densidad. Sin embargo, los estudios de migración que emplean simulantes alimentarios deben considerarse estimativos o informativos, ya que no consideran la interacción entre la matriz del alimento y las nanopartículas.

La matriz del alimento puede ocasionar alteraciones en las propiedades de las nanopartículas (composición química, tamaño, morfología, estabilidad, y propiedades superficiales, como puede ser la carga). Por tanto, estudiar las transformaciones que las nanopartículas pueden sufrir, una vez que entran en contacto con el alimento, es de vital importancia para establecer de forma correcta su impacto sobre la salud. (McClements *et al.*, 2016). Por ejemplo, estudios realizados sobre el efecto de la naturaleza de la matriz alimentaria, como la sopa de tomate o el pollo, sobre las características físico-químicas de las nanopartículas de SiO₂ y Ag, evidenciaron una disminución de su tamaño y una mayor aglomeración de las mismas. Asimismo, también se detectó la parcial disolución de las AgNPs a plata iónica como consecuencia de las transformaciones químicas sufridas al interaccionar con la propia matriz del pollo (Grombe *et al.*, 2013; Loeschner *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014).

En la evaluación de los riesgos de exposición a este tipo de materiales no es solo importante estudiar los posibles cambios que estas pueden sufrir, como consecuencia de su interacción con el alimento, sino que también es necesario investigar su comportamiento una vez que son ingeridas. La EFSA emitió en 2018 unas directrices sobre la evaluación de los riesgos asociados al empleo de la nanociencia y la nanotecnología en la cadena alimentaria. En ellas se hace hincapié en la importancia de realizar estudios sobre el comportamiento de las nanopartículas en el tracto gastrointestinal. Para ello, se propone el empleo de métodos *in vitro* e *in vivo* con el fin de evaluar los posibles efectos de las nanopartículas una vez ingeridas (EFSA, 2018c).

Los ensayos *in vitro* tienen como objetivo mimetizar, a escala de laboratorio, las condiciones mecánicas y fisiológicas (composición de enzimas y sales, pH, temperatura, tiempo de permanencia) de cada etapa del proceso de digestión gastrointestinal (McClements *et al.*, 2016) (Figura 10). En estos procesos de digestión *in vitro*, el término bioaccesibilidad hace referencia a la fracción del nutriente ingerido que pasa desde el alimento al medio gastrointestinal, y que por tanto se muestra disponible para su absorción en el intestino (Fernández-García *et al.*, 2009). Por otro lado, la biodisponibilidad se refiere a la fracción del componente ingerido que es capaz de atravesar la barrera intestinal y, por tanto, llegar al sistema sanguíneo para ser utilizado en las diferentes funciones fisiológicas o para ser almacenado (Etcheverry *et al.*, 2012) (Figura 10). La determinación de la fracción biodisponible se realiza aplicando un proceso de diálisis, en la última etapa del proceso de digestión, es decir, al producto derivado de la etapa intestinal. Como alternativa a la diálisis, también se emplean líneas celulares intestinales, como son las Caco-2, derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, y

que simulan la morfología y funciones de los enterocitos maduros del intestino delgado (Lefebvre *et al.* 2019).

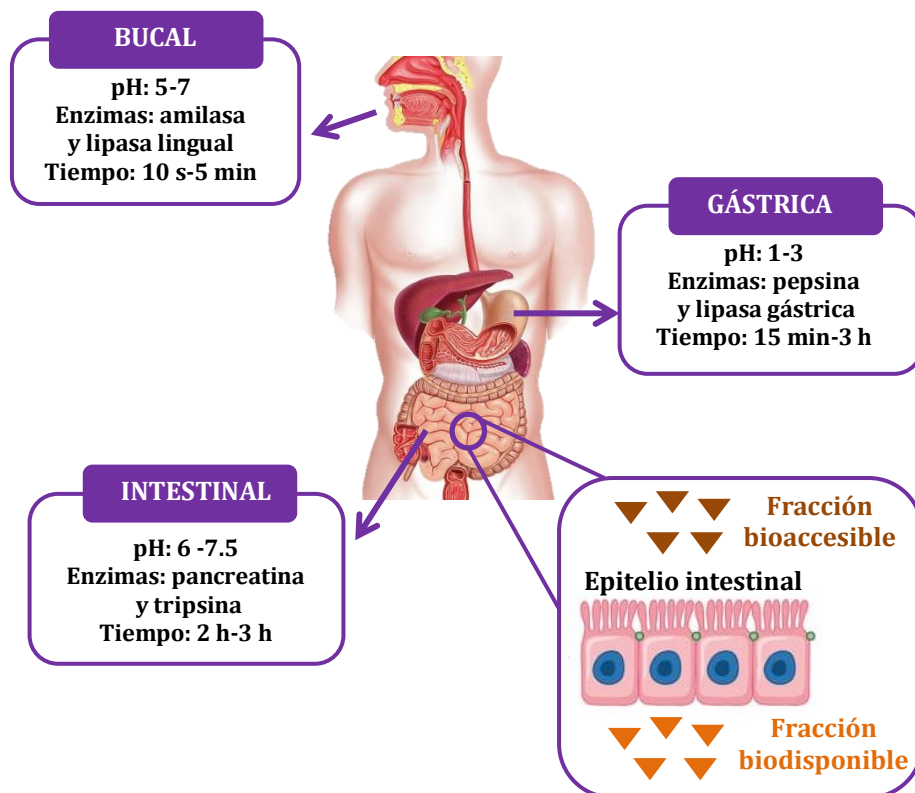


Figura 10. Etapas de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Concepto de bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Adaptación de Guerra *et al.*, 2012.

Los ensayos gastrointestinales *in vitro* se han aplicado a las AgNPs, concluyéndose que las condiciones dadas en la etapa bucal no afectan a las propiedades de estas partículas, mientras que tras la etapa gástrica e intestinal se detecta un incremento en el tamaño de las mismas, debido a la adsorción de proteínas en la superficie de la partícula (Böhmert *et al.*, 2014). Por otro lado, otros estudios con las mismas nanopartículas indican la liberación de plata iónica procedente de la disolución de nanopartículas, debido a los bajos valores de pH (cerca de 2) propios de la etapa gástrica (Mwilu *et al.*, 2013; Walczak *et al.*). Es importante resaltar los distintos resultados en porcentajes de bioaccesibilidad obtenidos cuando las AgNPs se encuentran en dispersión acuosa y en un alimento. En el primer caso, el 82 % de las nanopartículas se encontraron en el extracto intestinal, mientras que en el segundo, solamente el 13 % de las nanopartículas consiguieron llegar a la barrera intestinal (Ramos *et al.*, 2017). Resultados similares se han descrito en estudios con nanopartículas de óxidos metálicos como ZnO, TiO₂, CeO₂ y Fe₃O₄. Las nanopartículas se agregaban en mayor o menor medida al ponerlas en contacto con los jugos gastrointestinales. Además, las ZnONPs mostraron un elevado grado de solubilidad

en la etapa gástrica obteniéndose porcentajes de bioaccesibilidad bastante elevados (Zhong *et al.*, 2017).

Por último, las nanopartículas de Ag y ZnO han mostrado tener un efecto citotóxico frente a células Caco-2. En el caso de las ZnONPs este efecto parece estar asociado a estrés oxidativo, pues se observó una disminución significativa de los niveles de la enzima superóxido dismutasa, y una variación también significativa en los niveles de la enzima glutatión peroxidasa y de especies reactivas de oxígeno presentes en los cultivos celulares. Sin embargo, en el caso de las AgNPs, no se observaron indicios de dicho estrés oxidativo celular (Song *et al.*, 2014).

3.2. Legislación Europea sobre el empleo de nanomateriales en la industria alimentaria.

Los grandes avances de la nanotecnología, y su elevada aplicabilidad en la industria alimentaria, hacen que se prevea un crecimiento exponencial de la presencia de estos materiales en el ámbito de la alimentación. Esto hace que sea de vital importancia la elaboración de leyes específicas que regulen la incorporación de los nanomateriales en alimentos. Desafortunadamente, no existe un marco regulatorio común que aborde el uso de los nanomateriales en el sector alimentario. La causa de esto puede tener su origen en la complejidad de estos nanomateriales y sus diversas características y aplicaciones, que unido a la falta de datos relevantes y fiables sobre sus efectos toxicológicos, hace que sea muy complicado la creación de un acuerdo común internacional regulatorio. En este sentido, durante los últimos años, la Unión Europea ha desarrollado un marco regulatorio específico para la industria alimentaria en la que los nanomateriales están explícita o implícitamente incluidos. Sin embargo, los esfuerzos por desarrollar este marco legal se han dirigido hacia la reglamentación de medidas de bajo grado de obligatoriedad, como pueden ser comunicaciones y resoluciones, recomendaciones, opiniones o guías, en vez de dictar normas jurídicas de carácter vinculante. Además, el contenido difuso del marco legislativo hace que, en ocasiones, sea difícil trazar una línea entre lo que está permitido y lo que no, que junto con la falta de indicaciones para su aplicación dificulta enormemente su implementación (Rauscher *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2018).

A continuación, se van a describir las normas legislativas Europeas en las que se incluye de manera explícita o implícita alguna indicación sobre el uso de nanomateriales en el ámbito alimentario.

El empleo de aditivos alimentarios está legislado de acuerdo a la normativa (CE) N° 1333/2008. Esta directiva establece que si detectan variaciones en el tamaño de partícula de un aditivo alimentario (debido a su proceso de manufacturación), el aditivo alimentario se considerará como un aditivo diferente y, antes de su comercialización, deberá incluirse esta modificación de tamaño en sus especificaciones (EU, 2008). Como ya se ha mencionado anteriormente, el TiO_2 (E171) y el SiO_2 (E551) aparecen en la lista de aditivos alimentarios autorizados por la UE en el Reglamento (CE) N° 1129/2011 que modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 (EU, 2011c). Sin embargo, dicha normativa no especifica de forma clara si estos aditivos pueden ser utilizados en forma nanoparticulada. En el año 2016, la EFSA llevó a cabo una revaluación del aditivo E171 como parte de su programa de revisión de los riesgos asociados a la exposición a aditivos permitidos. En el informe emitido como resultado de dicha evaluación, se concluyó que el aditivo E171 no es un nanomaterial (según las recomendaciones de la UE sobre la definición de nanomaterial), puesto que su fracción en forma nanoparticulada (<100 nm) era inferior al 3.2 % en masa del aditivo. Además, se especifica que la absorción de este aditivo (de tamaño micro y nano) en el tracto gastrointestinal como consecuencia de una administración oral es negligible, y que además no existen diferencias en su absorción, distribución y excreción independientemente de si se encuentra en forma de micro o de nanopartícula. También se indica que la ingesta oral de partículas de TiO_2 (de tamaño micro y nano) a los niveles encontrados no suponen un riesgo de carácter genotóxico, aunque no se determina con certeza su efecto en el sistema reproductivo, debido a la incertidumbre de los datos toxicológicos existentes relacionados con este aspecto. Finalmente, cabe destacar que el informe de expertos recomienda que en las especificaciones que la UE proporciona sobre este aditivo deberían estar presentes los límites permitidos en tamaño de partícula (EFSA, 2016b).

A raíz de esta última recomendación y atendiendo también a recomendaciones similares realizadas por La Agencia Francesa de Seguridad, Salud Ambiental y Ocupacional (ANSES) sobre el aditivo E171, la EFSA emite en Junio de 2019 una nueva opinión científica sobre la necesidad de incluir en las especificaciones de la UE parámetros adicionales relacionados con la distribución de tamaños del aditivo E171. En concreto, se recomienda incluir un tamaño mínimo de las partículas constituyentes de este aditivo de 100 nm, especificando que menos del 50 % de estas partículas pueden encontrarse por debajo de este límite (EFSA, 2019).

Analogamente, el aditivo SiO_2 (E551) ha sido objeto de revaluación por parte de la EFSA, especificándose en el documento resultante que este aditivo está compuesto por

agregados de nanopartículas con un diámetro mayor a los 100 nm, pero sin excluir la posibilidad de que alguno de estos agregados estuviera por debajo de este tamaño (EFSA, 2018a). Otros aditivos que han sido o están siendo objeto de nuevas evaluaciones por parte de la EFSA son: carbonato de calcio (E170), carbón vegetal (E153), óxidos de hierro (E172), plata (E174) y oro (E175).

En relación al etiquetado de alimentos, el Reglamento (UE) N° 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor establece que "todos los ingredientes presentes en la forma de nanomateriales artificiales deben indicarse claramente en la lista de ingredientes". Además, se señala que los nombres de estos ingredientes deben ir seguidos del término *nano* entre paréntesis. Asimismo, para aclarar el término "nanomaterial artificial" se incluye la siguiente definición: "cualquier material producido intencionadamente que tenga una o más dimensiones del orden de los 100 nm o inferior, o que esté compuesto de partes funcionales diferenciadas, internamente o en superficie, muchas de las cuales tengan una o más dimensiones del orden de 100 nm o inferior, incluidas estructuras, aglomerados o agregados, que pueden tener un tamaño superior a los 100 nm, pero que conservan propiedades que son características de la nanoescala" como por ejemplo "las relacionadas con la elevada superficie específica de los materiales considerados, y/o las propiedades físico-químicas específicas que son distintas de la forma no nanotecnológica del mismo material". Por tanto, en este reglamento aparece una nueva definición de nanomaterial en la que no se especifica un porcentaje concreto de partículas por debajo de los 100 nm, aunque sí se establece que aun siendo el tamaño de partícula mayor de 100 nm, si tienen propiedades propias de los nanomateriales deberían considerarse como tales.

Por otro lado, el Reglamento (UE) 2015/2283 del PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO relativo a los nuevos alimentos, establece normas para la comercialización y utilización de estos nuevos productos en la Unión Europea (EU, 2015). Dicho reglamento especifica que todo alimento que contenga o consista en nanomateriales artificiales debe ser considerado como un nuevo alimento con el fin de garantizar la seguridad y los intereses de los consumidores. Según la definición incluida en este documento, "un nuevo alimento es todo aquel que no haya sido utilizado en una medida importante para el consumo humano en la Unión antes del 15 de mayo de 1997, con independencia de las fechas de adhesión de los Estados miembros a la Unión". Además, se especifica que el nuevo alimento debe estar incluido al menos en una de las categorías que se especifican tras la definición siendo una de ellas "alimentos que consistan en nanomateriales artificiales". A raíz de esta especificación, en este reglamento se vuelve a incluir la

definición de nanomaterial artificial acorde con el Reglamento (UE) N° 1169/2011 (EU, 2011d). De igual manera, se indica que la EFSA será el organismo encargado de establecer la seguridad de los nuevos alimentos antes de ser autorizados como tales. Además dicho organismo debe comprobar que cuando un nuevo alimento consista en nanomateriales artificiales, se empleen métodos de análisis específicos para su estudio. Sin embargo, aunque en el Reglamento (UE) 2015/2283 se hace alusión a los nanomateriales, ninguno de ellos aparece en la lista de nuevos alimentos autorizados o notificados que se establece en el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 (EU, 2015; EU, 2017).

Por último y en relación al empleo de nanomateriales en envases alimentarios aparecen dos reglamentos: el Reglamento (CE) N° 450/2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos y el Reglamento (UE) N° 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. En el primero, como se ha especificado en el apartado anterior, se habla de envases inteligentes y se indica que los sistemas inteligentes pueden colocarse en la superficie externa del envase y separarse del alimento mediante una barrera funcional situada dentro de los materiales u objetos en contacto con los alimentos, detrás de la cual pueden utilizarse sustancias no autorizadas. Sin embargo, en el caso de que estas sustancias fueran nanomateriales, se deberá evaluar caso por caso los riesgos asociados a su empleo excluyéndose por tanto del concepto general de barrera funcional antes citado (EU, 2009). Esta misma directriz aparece en el Reglamento (UE) N° 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Además se indica en particular que las sustancias en nanoforma solo se usarán si se autorizan y se mencionan en las especificaciones del anexo I de dicho Reglamento. En este anexo la única sustancia que aparece en forma nanoparticulada es el nitrato de titanio. Además en las “Restricciones y especificaciones” que corresponden a esta sustancia se indica que solo se puede utilizar en botellas de PET hasta 20 mg/kg. Asimismo, se especifica que los aglomerados de nanopartículas de nitrato de titanio tienen un diámetro de 100-500 nm con nanopartículas primarias con un diámetro aproximado de 20 nm (EU, 2011b).

En la Tabla 3 aparece un resumen de la normativa existente en relación al empleo de nanomateriales en la industria alimentaria.

Tabla 3. Normativa de la Unión Europea relacionada con el ámbito alimentario donde se considera el empleo de nanomateriales.

Normativa	Área de aplicación	Alusiones a nanomateriales
(CE) N° 1333/2008	Aditivos alimentarios	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cambio en el tamaño de partícula de un aditivo alimentario autorizado se considerará un nuevo aditivo alimentario diferente. 2. TiO₂ (E171), SiO₂ (E551), Ag(E174) y Au(E175) aparecen en la lista de aditivos autorizados pero no se especifica si pueden emplearse en forma nanoparticulada.
(UE) N° 1169/2011	Etiquetado de alimentos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los ingredientes en forma de nanomateriales artificiales deben indicarse en la lista de ingredientes. 2. Aparece definición de nanomaterial artificial en la que no se especifica el % de partículas por debajo de 100 nm y en la que se considera agregados de más de 100 nm.
(UE) N° 2015/2283	Nuevos alimentos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Todo alimento que contenga nanomateriales artificiales debe considerarse nuevo alimento. 2. EFSA debe de evaluar los riesgos para la seguridad alimentaria derivada de los nuevos alimentos. 3. La evaluación de los riesgos se debe realizar utilizando metodología adecuada a las propiedades de los nanomateriales. 4. No aparecen nanomateriales en la lista de nuevos alimentos autorizados del Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470.
(CE) N° 450/2009	Envases alimentarios activos e inteligentes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los sistemas inteligentes formados por nanomateriales deberán ser evaluados caso por caso antes de incorporarlos detrás de la barrera funcional.
(UE) N° 10/2011	Envases alimentarios	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los sistemas inteligentes formados por nanomateriales deberán ser evaluados caso por caso antes de incorporarlos detrás de la barrera funcional. 2. Solo se podrán utilizar las sustancias en nanoforma si aparecen en el anexo I de este reglamento. La única sustancia en nanoforma que aparece en el anexo I es el nitrato de titanio.

4. Nanopartículas basadas en selenio y telurio como alternativa a las nanopartículas metálicas convencionales.

Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas metálicas y de sus correspondientes óxidos cada vez adquieren un mayor protagonismo. Por una parte, se desarrollan nuevas aplicaciones y, por otra, se estudian los posibles efectos adversos que estos materiales pueden tener, tanto para la salud humana como para los ecosistemas. Sin

embargo, el desarrollo de nuevos materiales no deja de crecer. Un caso particular es la síntesis, caracterización y aplicaciones de nanopartículas basadas en metaloides. En la presente Tesis Doctoral nos vamos a centrar en las nanopartículas de selenio y de telurio, por sus excelentes propiedades y menor toxicidad en comparación con algunas de las nanopartículas metálicas más empleadas, como por ejemplo las nanopartículas de plata.

4.1. Nanopartículas de selenio.

El selenio (Se) se considera un elemento traza esencial para los seres vivos debido principalmente a que desempeña funciones biológicas y bioquímicas primordiales para el correcto funcionamiento de los organismos. Esto es, principalmente, gracias a sus propiedades antioxidantes y papel fundamental en el sistema inmunológico, así como en el funcionamiento normal de la glándula tiroidea. Además, se conoce que está involucrado en la prevención de enfermedades cardiovasculares, de fertilidad, de algunos tipos de cáncer, y también que ejerce un papel antagónico frente a los efectos tóxicos de muchos metales o metaloides, entre los que se encuentran: arsénico, cadmio, mercurio y plomo. Sin embargo, los efectos que tiene el selenio dependen tanto de la concentración en la que esté presente como de su forma química (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). El selenio se puede encontrar en multitud de formas químicas: compuestos inorgánicos (iones selenito (SeO_3^{2-}) y seleniato (SeO_4^{2-})) y especies orgánicas (Tan *et al.*, 2016), de las que cabe destacar los selenoaminoácidos (Figura 11) (Kieliszek & Blazejak, 2013).

El papel esencial del selenio está relacionado con su incorporación a las proteínas de manera específica en forma de selenocisteína (SeCys), formando las llamadas “selenoproteínas”, donde se sitúa en el centro activo de las mismas. Esto es posible debido a la capacidad que tiene este elemento de sustituir el azufre en biomoléculas gracias a la similitud química entre ambos elementos (López-Heras *et al.*, 2011; Rayman, 2012). Por otro lado, el selenio en forma de selenometionina (SeMet) puede participar en la síntesis de proteínas, incorporándose de manera inespecífica en lugar de la metionina, originando las denominadas “proteínas que contienen selenio” (Suzuki, 2005; Arnér, 2010).

Entre las selenoproteínas más conocidas se encuentran las familias glutatión peroxidasa (GPx), tiorredoxinareductasa (TR) y yodotiroinadeyodinasas (ID). Las proteínas de la familia GPx presentan una función antioxidante en las células actuando como catalizadores en la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, la enzima TR está implicada en la degradación de los peróxidos fuera de las membranas celulares contribuyendo a la homeostasis redox celular, aunque también está involucrada en el crecimiento celular y en la recuperación del estrés oxidativo. En cuanto a la familia

de proteínas ID, su función biológica es principalmente endocrina, mediante la regulación del nivel de la forma activa de la hormona tiroidea 3,3-5-triyodotironina (T3) (López-Heras *et al.*, 2011; Hatfield *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2015).

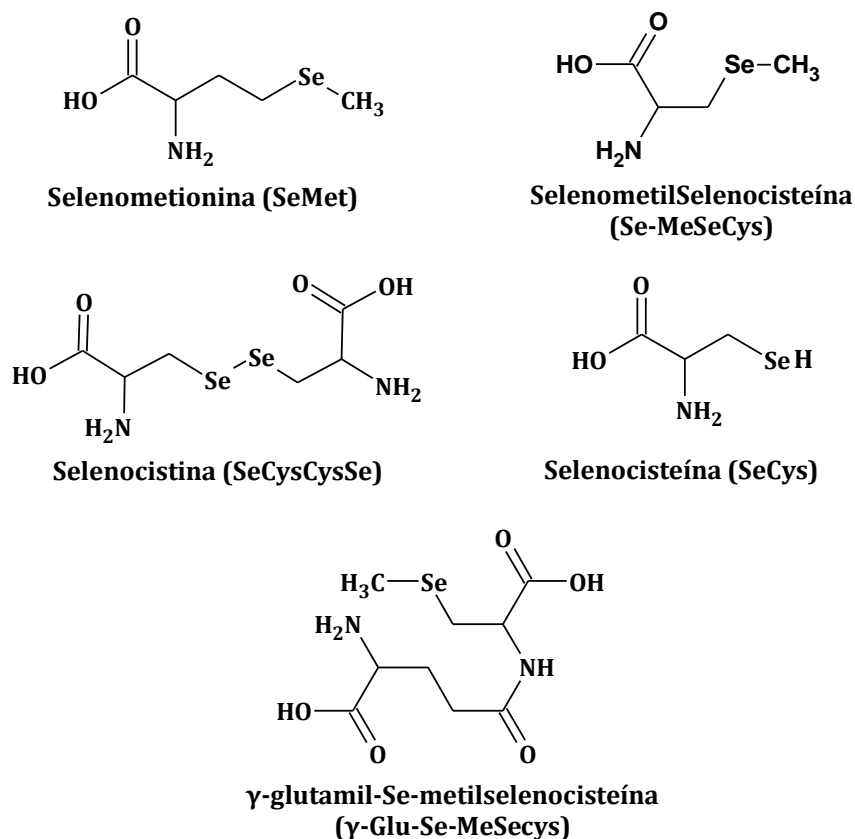


Figura 11. Selenoaminoácidos de mayor relevancia biológica.

Como se ha visto hasta ahora, el selenio tiene un papel esencial en multitud de funciones biológicas siendo, en consecuencia, necesaria una ingesta adecuada de este elemento para un buen funcionamiento del organismo. De hecho, está bien documentado que estados carenciales de selenio puede dar lugar al desarrollo de enfermedades, como por ejemplo, la conocida enfermedad de Keshan, que produce miocardiopatías principalmente en niños y mujeres, o la enfermedad de Kashin-Beck, relacionada con malformaciones en huesos y cartílagos, la cual se inicia en la infancia y pubertad y continúa hasta que cesa el crecimiento del individuo (Chen *et al.*, 1998; Rayman, 2000; Negro *et al.*, 2008). Asimismo, la deficiencia de selenio también puede favorecer enfermedades relacionadas con la deficiencia de yodo, como por ejemplo el bocio o el cretinismo, o incluso aumentar el riesgo de enfermedades causadas por virus, como el VIH, hepatitis, sarampión o gripe (Rayman, 2000; Combs, 2001; Aguilar *et al.*, 2009; Rayman, 2012; Ahsan *et al.*, 2014). Además, cuando los niveles de selenio en el organismo no han sido suficientes, se ha observado problemas de fertilidad y una mayor incidencia de

abortos y preeclampsia en mujeres embarazadas. Por otro lado, numerosos estudios también sugieren que estados carenciales de selenio están ligados a problemas en el sistema inmune, a enfermedades de tipo coronario, e incluso a enfermedades relacionadas con el sistema nervioso (Alzheimer), o a estados de depresión o ansiedad (Loef *et al.*, 2011; Varikasuvu *et al.*, 2019).

Como contraposición a lo expuesto, el selenio también está considerado un elemento tóxico. De este modo, se dice que este elemento tiene una doble cara, ya que si se ingieren las cantidades adecuadas es beneficioso y necesario para el buen funcionamiento del organismo, pero si se supera un cierto límite ($>400 \mu\text{g Se/día}$), es tóxico. De hecho, el margen existente entre toxicidad y esencialidad es muy estrecho, y depende de la concentración y forma química en la que esté presente. En este sentido, las especies orgánicas de selenio son mucho menos tóxicas que las especies inorgánicas. Por ejemplo, se ha descrito que el Se(IV) y el Se(VI) es 40 veces más tóxico que las especies orgánicas de selenio (Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018). Una exposición a elevados niveles de selenio puede producir dolor de cabeza, mareos, disnea, fatiga, náuseas, vómitos, mal aliento e irritación de las membranas mucosas de los ojos y del tracto respiratorio superior. Por otro lado, la sobredosis crónica (selenosis), producida normalmente por consumo de alimentos de elevado contenido de selenio, puede provocar inestabilidad emocional, depresión, dermatitis, sudores, mareos, problemas gastrointestinales y hasta pérdida de pelo y uñas (Vinceti *et al.*, 2001).

La cantidad diaria recomendada de selenio en la dieta varía en función del país, edad y sexo. En la Tabla 4 se especifican los valores de la dosis de selenio diaria recomendada por distintas instituciones (Kipp *et al.*, 2015; Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018).

Tabla 4. Dosis diaria de selenio recomendada según diferentes instituciones (suponiendo un peso corporal de 70.7 kg en hombres y 60 kg en mujeres)

Población	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN)	EFSA	Instituto de Medicina de Estados Unidos
Hombres	70 $\mu\text{g Se/día}$	70 $\mu\text{g Se/día}$	55 $\mu\text{g Se/día}$
Mujeres	55 $\mu\text{g Se/día}$	60 $\mu\text{g Se/día}$	
Mujeres en periodo de lactancia		75 $\mu\text{g Se/día}$	

Nanopartículas de selenio (SeNPs).

El desarrollo exponencial de la nanotecnología ha hecho que la atención sobre el selenio se desplace hacia una nueva especie: las nanopartículas de selenio. Este creciente interés se justifica en sus excelentes propiedades biológicas como su efecto antioxidante, anticancerígeno o antimicrobiano, y a su baja toxicidad en comparación a otras especies de selenio (Hatfield *et al.*, 2009; Thakkar *et al.*, 2010).

La síntesis de nanomateriales requiere generalmente el control de parámetros específicos, como son el propio método de síntesis, composición y concentración del precursor, el pH, la temperatura o el tiempo de reacción. Todos estos parámetros afectan directamente al tamaño, morfología y composición de las nanopartículas sintetizadas (Chiou *et al.*, 2011). Las metodologías para la síntesis de SeNPs incluyen métodos físicos, químicos y biológicos, siendo los dos últimos los más utilizados (Figura 12) (Skalickova *et al.*, 2017).

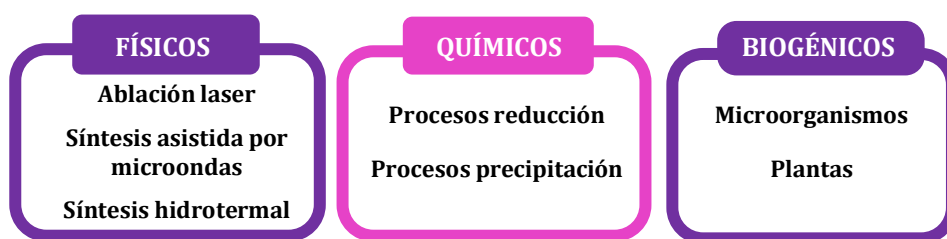


Figura 12. Métodos más empleados para la síntesis de SeNPs (Skalickova *et al.*, 2017).

Los métodos químicos, concretamente los procesos de oxidación-reducción, son los más empleados para la síntesis de estas nanopartículas. De manera general, se parte de una sal inorgánica como es el Na_2SeO_3 y se lleva a cabo la reducción de Se (IV) a Se^0 mediante el empleo de un agente reductor en medio acuoso y a pH neutro (Chhabria & Desai, 2016). Los agentes reductores mas empleados han sido: ácido ascórbico, citrato sódico, borohidruro sódico, tiosulfato sódico, tripolifosfato sódico, L-cisteína, polifenoles como el ácido gálico o la quercitina, etc., (Zhong-Hong & Chris-Wang, 2005; Li *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Pettibone *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2014; Palomo-Siguero *et al.*, 2017a). Además de la sal precursora y el agente reductor, también es necesario emplear un agente estabilizante que recubra la superficie de las nanopartículas, evitándose así su agregación. El agente estabilizante afecta notablemente a la carga superficial y al tamaño de la nanopartícula obtenida. El recubrimiento permite además introducir en la superficie de la nanopartícula grupos funcionales, haciéndola más reactiva y, permitiendo así, su unión a diferentes tipos de moléculas y biomoléculas, lo que les otorga propiedades específicas para su posterior utilización en diversas aplicaciones. Asimismo, el empleo de

biomoléculas como agentes de recubrimiento facilita su compatibilidad con aplicaciones biomédicas y en productos de consumo. Los compuestos más utilizados como agentes estabilizantes son proteínas (BSA), sacáridos (glucosa, sucrosa, etc.), el quitosano, la hidroxietilcelulosa (HEC) y tensioactivos no iónicos (Tritón X-100) (Palomo-Siguero *et al.*, 2017b; Bai *et al.*, 2018).

Por otro lado, las nanopartículas de selenio pueden obtenerse de foma biogénica mediante el empleo de bacterias, hongos y plantas (plantas completas, tejidos y extractos de plantas). Esta forma de síntesis está en consonancia con los principios de la química verde, ya que reduce notablemente el empleo de sustancias químicas y la aplicación de condiciones drásticas de presión y temperatura. En ese sentido, las bacterias Gram negativas y Gram positivas son capaces de reducir el selenito y el selenato a nanopartículas de selenio elemental como mecanismo de detoxificación, debido a que el Se^0 es menos tóxico. La síntesis biogénica de las nanopartículas mediante bacterias puede ser extracelular, intracelular o estar asociada a la membrana bacteriana (Wadhwani *et al.* 2016). En la Tabla 5, se muestran ejemplos de bacterias capaces de sintetizar SeNPs de manera biogénica.

Tabla 5. Bacterias formadoras de SeNPs biogénicas.

Bacteria	Tamaño (nm)	Localización	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	140	Extracelular	Dwivedi <i>et al.</i> 2013
<i>Escherichiacoli K-12</i>	24-122	Extracelular	Dobias <i>et al.</i> 2011
<i>Shewanella sp.</i>	11-20	Intracelular	Tam <i>et al.</i> 2010
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	90-320	Extracelular	Kazempour <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	50-500	Intracelular	Zhang <i>et al.</i> 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	250	Intracelular	Yazdian <i>et al.</i> 2013
<i>Lactobacillus reuteri</i>	50-200	Extracelular	Moreno <i>et al.</i> 2017a
<i>Bacillus mycoides</i>	50-400	Extracelular	Lampiset <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	50-400	Extracelular	Wang <i>et al.</i> 2010
<i>Bacillus cereus</i>	150-200	Intracelular	Dhanjal <i>et al.</i> 2010

Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de selenio (SeNPs).

Las nanopartículas de selenio (SeNPs) son objeto de estudio en numerosas áreas científicas, Por ejemplo, en el campo de la medicina, estas nanopartículas se han considerado como herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, diabetes y cáncer (Khurana *et al.*, 2019).

El carácter quimiopreventivo de las SeNPs parece estar relacionado con la inhibición de la proliferación celular por apoptosis y la activación de las caspasas (enzimas

críticas para la inducción de apoptosis), la modulación del estado redox, la inhibición de la angiogénesis (proceso fundamental en el crecimiento tumoral) y la estimulación del sistema inmune (Huang *et al.*, 2013; Estevez *et al.*, 2014; López-Heras *et al.*, 2014a). Su actividad anticancerígena se ha comparado con otras especies de selenio orgánico, como son la Se-MeSeCys y SeMet, también con carácter quimiopreventivo, encontrándose la misma capacidad para aumentar la actividad de las selenoproteínas y de otras enzimas, con una toxicidad reducida (Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). De forma análoga, se ha demostrado que las SeNPs pueden utilizarse como sistemas de liberación controlada de fármacos, donde las nanopartículas pueden dirigirse específicamente y acumularse en las células tumorales y cancerígenas tras conseguir su unión con moléculas diana (Guan *et al.*, 2018).

En pacientes diabéticos, los procesos inflamatorios y de estrés oxidativos, como consecuencia de elevados niveles de glucosa en sangre, están involucrados en la evolución de la diabetes mellitus tipo I. Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las SeNPs hacen que estas sean una alternativa para el tratamiento de este tipo de diabetes, ofreciendo protección contra el daño oxidativo y actuando como agente hipoglucémico, creando de esta forma un ambiente hormonal que ayude a la sensibilización de la insulina (Guan *et al.*, 2018). En esta línea, Al-Quraishy *et al.* estudiaron el efecto hipoglucémico de las SeNPs en ratas con diabetes mellitus tipo I. La administración de SeNPs durante 28 días disminuyó notablemente los niveles de glucosa en sangre, originando además un aumento de los niveles de insulina en el suero sanguíneo (Al-Quraishy *et al.*, 2015).

Por otro lado, las SeNPs han sido consideradas como una alternativa frente a infecciones microbianas por su excelente actividad antibacteriana y antifúngica. Actualmente, existe una creciente preocupación por el aumento de enfermedades nosocomiales adquiridas en el ámbito hospitalario debido al crecimiento de microorganismos en dispositivos médicos, lo que causa cerca del 65 % de las infecciones intrahospitalarias (Malherio *et al.*, 2017). Como se ha comentado anteriormente, la nanotecnología puede considerarse como una alternativa para prevenir y combatir la formación de biopelículas bacterianas en dispositivos médicos como catéteres, válvulas cardíacas, marcapasos, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, sondas urinarias, prótesis, etc., (Mu *et al.*, 2016). En este sentido, las AgNPs han sido ampliamente estudiadas para eliminar este problema, dando lugar a resultados prometedores que han hecho que en la actualidad se estén empleando como recubrimiento de dispositivos médicos para controlar la proliferación de microorganismos, y así prevenir la adquisición de enfermedades nosocomiales en hospitales (Monteiro *et al.*, 2009; Sussman *et al.*, 2015;

Kumaret *et al.*, 2018). Debido a la toxicidad intrínseca de la propia plata, las SeNPs se han propuesto como alternativa por su excelente capacidad antimicrobiana y su menor toxicidad. De hecho, estudios realizados en esta línea han mostrado que la inmovilización de SeNPs en materiales usados para fabricar dispositivos médicos (por ejemplo el PVC) inhiben el crecimiento de patógenos en estos dispositivos, como es el caso de *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013).

Aplicaciones de las nanopartículas de selenio (SeNPs) en el sector alimentario.

Las nanopartículas de selenio tienen dos líneas de aplicación en la industria alimentaria. Por un lado, sus propiedades antibactericidas y antioxidantes hacen que puedan ser consideradas apropiadas para la fabricación de envases alimentarios, y por otro lado, la esencialidad del selenio y sus propiedades beneficiosas, pueden hacer de las SeNPs una nueva vía de incorporación de este elemento esencial al organismo, a través de la dieta, mediante el desarrollo de alimentos funcionales.

SeNPs para el desarrollo de envases alimentarios.

En el campo de la alimentación es importante un control muy exhaustivo de patógenos, ya que su presencia puede comprometer seriamente la salud del consumidor. La capacidad antimicrobiana de las SeNPs frente a patógenos unida a sus excelentes propiedades antioxidantes, han hecho que se planteen como una alternativa para el desarrollo de materiales de uso alimentario (Khiralla *et al.*, 2015). El mecanismo más aceptado mediante el cual estas partículas ejercen un efecto antimicrobiano es la adhesión de las nanopartículas a la pared celular bacteriana y la posterior liberación de selenio iónico al interior de la bacteria, causando estrés oxidativo, inhibición de la síntesis de proteínas y mutaciones en el ADN bacteriano (Skalickova *et al.*, 2017).

Por ejemplo, Vera *et al.* desarrollaron un material multicapa con propiedades antioxidantes mediante la incorporación de SeNPs. Como ya se ha comentado, en la actualidad la legislación europea prohíbe el empleo de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos en superficies que están en contacto directo con los alimentos, y por ello las SeNPs se incorporaron al adhesivo que unía las láminas de poli(etilentereftalato) (PET) y polietileno (PE) que formaban el material multicapa. Una vez desarrollado este material, se evaluó tanto su capacidad antioxidante como la posible migración de las SeNPs incorporadas en el material adhesivo. Los resultados obtenidos mostraron una buena capacidad antioxidante del envase desarrollado con SeNPs y niveles de migración de Se por debajo de los límites máximos permitidos. De esta manera, se obtuvo un envase activo

capaz de proteger el producto envasado frente a la oxidación producida por la eliminación de los radicales libres presentes en el alimento (Vera *et al.*, 2016). En enero de 2018, la EFSA publicó una opinión científica en la que se evaluaba la seguridad de este envase alimentario. El panel de expertos concluyó que no existían riesgos para el consumidor cuando las SeNPs eran incorporadas al adhesivo del material multicapa, y este era puesto en contacto con cualquier alimento bajo cualquier condición (EFSA, 2018c).

SeNPs para incrementar los niveles de selenio en el organismo.

El papel fundamental del selenio en multitud de procesos biológicos hace que una dieta con bajo contenido en este elemento pueda ocasionar problemas cardiovasculares, diabetes, trastornos tiroideos o problemas de fertilidad masculina. La principal fuente de selenio para el organismo son los alimentos, siendo las nueces de Brasil, el pescado, los mariscos, la carne y los cereales los que mayor contenido en selenio presentan (Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018). Sin embargo, existen regiones en el mundo donde la concentración de selenio en el suelo es baja, lo que se traduce en una menor cantidad de este elemento en vegetales y, por tanto, también en animales. Teniendo en cuenta que la principal forma de incorporación de Se en el organismo es a través de la dieta, las enfermedades asociadas a estados carenciales de selenio son más comunes en este tipo de regiones que son principalmente Europa del Este, Nueva Zelanda, noreste de China y Africa (Rayman *et al.*, 2000; Rayman *et al.*, 2012). Para dar solución a este problema, se han intentado incrementar los niveles de selenio en la dieta, principalmente, mediante la suplementación directa, la biofortificación de cultivos o por medio del desarrollo de alimentos funcionales (Alfthan *et al.*, 2015). Sin embargo, es de vital importancia tener en cuenta que no solo es necesario ingerir una correcta cantidad de selenio, sino en una forma química adecuada, puesto que de ello depende la eficacia de su incorporación al organismo. En general, los complementos alimenticios que contienen Se suelen incluir selenio inorgánico, como sales de selenito o selenato, así como selenio orgánico, en forma de SeMet, SeCys o Se-MeSeCys (Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018).

La biodisponibilidad del Se en los alimentos depende de diversos factores como el tipo de alimento, la cantidad ingerida, la forma química, la solubilidad, la presencia de otros nutrientes y factores fisiológicos del organismo como la edad, el estado nutricional, la lactancia o el embarazo. Las formas orgánicas de Se tienen mayor biodisponibilidad que sus formas inorgánicas. En concreto, entre el 85-95 % de selenio orgánico de los alimentos es asimilado, mientras que en el caso de las especies inorgánicas solo se incorporan porcentajes comprendidos entre el 40 y el 50 % (Niedzielski *et al.*, 2016). Se cree que la

SeMet es la responsable de la elevada biodisponibilidad de Se en alimentos como los cereales o vegetales en comparación con los productos de origen cárnico, siendo especialmente baja en los pescados, posiblemente debido a su interacción con los compuestos de mercurio (Cabañero *et al.*, 2004; Pedrero & Madrid, 2009).

Además de las formulaciones tradicionales de Se descritas, las SeNPs también están siendo evaluadas para este fin, llegándose a considerar como suplementos dietéticos de nueva generación, debido a su mayor biodisponibilidad, menor toxicidad, a mecanismos de acción más controlados y/o dirigidos, y a la disminución de efectos secundarios (Skalickova *et al.*, 2017; Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018).

Asimismo, las SeNPs se han utilizado para la biofortificación de cultivos. Por ejemplo, el cultivo de plantas de *Raphanus sativus* en presencia de SeNPs dio como resultado la biotransformación del 95 % del contenido de SeNPs en especies orgánicas como Se-MeSeCys y SeMet (Palomo-Siguero *et al.*, 2015). La Se-MeSeCys es uno de los precursores del metilselenol, considerado un potencial agente anticancerígeno.

Por otro lado, las SeNPs también se han propuesto para el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en selenio. Un alimento funcional es aquel que proporciona beneficios para la salud, o previene la aparición de determinadas enfermedades, sin modificar las características organolépticas y el aporte de nutrientes del alimento convencional. El desarrollo de este tipo de productos puede realizarse adicionando algún ingrediente no presente en el alimento, o aumentando la concentración de alguno de los nutrientes que ya están presentes en el mismo (Pophaly *et al.*, 2014). Entre ellos, en los últimos años han destacado los llamados probióticos, que son organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped (Evivie *et al.*, 2017). En este sentido, entre los probióticos más consumidos se encuentran los basados en bacterias ácido lácticas (LAB). Este grupo de microorganismos, considerados como “GRAS” (Generally Recognized As Safe), se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para diversos fines: como cultivos iniciadores que controlan los procesos de fermentación, para conferir textura y sabor a los alimentos y para la conservación de los mismos. También son empleadas como probióticos por sus beneficios para la salud, debido principalmente a su efecto antimicrobiano, inmunomodulador, anticancerígeno y antioxidante. Algunas especies de este extenso grupo son capaces de unir, transportar y acumular metales en el interior de las células, por lo que han sido objeto de estudio como vehículo para incorporar elementos esenciales a la dieta (Mrvčić *et al.*, 2012).

Los procesos de unión de metales a las bacterias ácido lácticas dependen principalmente de las propiedades fisiológicas de la cepa y de las características físico-químicas del medio, pudiéndose producir por dos mecanismos básicos. Uno de ellos consiste en la unión del elemento a la pared celular mediante un proceso pasivo, no mediado metabólicamente, que se conoce como bioadsorción, y el otro lleva consigo asociado un proceso metabólico que permite la entrada de los elementos a través de la pared bacteriana, así como la acumulación de los mismos en el interior de la célula (bioacumulación). En esta línea, algunas especies del género *Lactobacillus* son capaces de acumular selenio y de biotransformar el selenio inorgánico a especies orgánicas de selenio o incluso producir de manera biogénica nanopartículas de selenio, por lo que son potenciales candidatas para el desarrollo de alimentos funcionales basados en probióticos enriquecidos en este elemento esencial (Pophaly *et al.*, 2014). De la misma manera, también se ha descrito que la especie *Lactobacillus bulgaricus* es capaz de transformar las SeNPs en compuestos orgánicos de selenio de manera más eficiente que si se añade Se (IV) al medio de cultivo (Palomo-Siguero *et al.*, 2016).

Asimismo, otro tipo de microorganismos que son capaces de transformar las especies de selenio inorgánicos en compuestos orgánicos, son las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras selenizadas contienen SeMet como especie mayoritaria, y en pequeña proporción metil-Se-glutación, Se-diglutación y Se-MeSeCys (Rayman, 2004; Goenaga-Infante *et al.*, 2006). Aparte de compuestos orgánicos de selenio, también se han encontrado SeNPs en este tipo de microorganismos (Jimenez-Lamana *et al.*, 2018).

4.2. Nanopartículas de telurio.

El telurio o telurio es un elemento metaloide que pertenece al grupo 16 de la tabla periódica, el cual también incluye elementos como el oxígeno, azufre, selenio y polonio. Por su proximidad, las propiedades químicas del telurio son muy parecidas a las del selenio, aunque presenta mayor carácter metálico. Sin embargo, a diferencia del selenio, el telurio no es un elemento esencial para el organismo, principal razón por la que este elemento no ha despertado tanto interés como su compañero de grupo, considerándose, en ocasiones, uno de los elementos más olvidados de la tabla periódica (Ba *et al.*, 2012). Sin embargo, sin ser esencial, sí se puede encontrar en el cuerpo humano en una cantidad mayor (>0.5 g) que otros elementos traza. Además, se ha descrito que este elemento químico presenta ciertas propiedades beneficiosas para el organismo aunque, como ocurre con el selenio, depende enormemente de la forma química en la que se encuentre,

pudiéndose hablar de formas orgánicas e inorgánicas de teluro. Como formas inorgánicas se pueden citar el teluro elemental (Te^0), el dióxido de teluro (TeO_2) y los aniones telururo (Te^{2-}), telurito (TeO_3^{2-}) y telurato (TeO_4^{2-}) (Sredini, 2012; Wuet *et al.*, 2019). El teluro elemental es mucho menos soluble que el selenio a pH fisiológico, y su oxidación a los aniones TeO_3^{2-} , TeO_4^{2-} o a TeO_2 ocurre fácilmente (Sredini, 2012; Wu *et al.*, 2019). En cuanto a los compuestos orgánicos, se puede hablar tanto de derivados metilados de teluro como de complejos, donde el teluro como átomo central está unido a diferentes ligandos orgánicos (Figura 13) (Cunha *et al.*, 2009). También se han descrito la presencia de aminoácidos derivados de Te como el óxido de metiltelurocisteína y el óxido de telurometionina, presentes como metabolitos en ciertos vegetales como el ajo (Anan *et al.*, 2013).

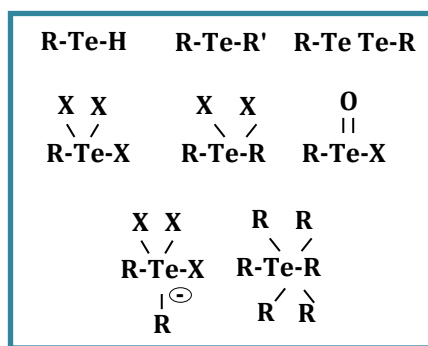


Figura 13. Estructura genérica de las especies orgánicas y complejos de teluro. X=Haluros.
Adaptación de Cunha *et al.* 2009.

Algunas especies orgánicas de teluro presentan actividad antioxidante y están involucrados en la inhibición de la angiogénesis, proceso fundamental en el crecimiento tumoral, por lo que también presentan actividad anticancerígena. Por otro lado, las formas inorgánicas, los aniones telururo, telurito y telurato, exhiben propiedades antimicrobianas. De hecho, a principios del siglo XX y antes de la era de la penicilina, el telurito fue empleado por sus excelentes propiedades bactericidas en el tratamiento de enfermedades como la lepra, tuberculosis, dermatitis o cistitis (Chasteenet *et al.*, 2009; Ba *et al.*, 2012; Goff & Yee, 2017; Nguyen *et al.*, 2019). Más recientemente, se ha considerado la posibilidad del empleo de este elemento para el desarrollo de fármacos en terapias contra el cáncer y como marcador biológico en diagnóstico. La principal razón para emplear el teluro en la diagnosis es debido a que su incorporación en aminoácidos como la cisteína o la metionina, y por tanto en las proteínas, ocurre de manera “natural”, es decir, no requiere procesos complicados de intercambio con los átomos de azufre ni tampoco la síntesis de péptidos. Por tanto, el intercambio del átomo de azufre por el átomo de teluro, que es más pesado, supone una ventaja para su empleo en los estudios de imagen por rayos X. También la incorporación del isótopo radiactivo $^{123\text{m}}\text{Te}$ en los ácidos grasos y su

acumulación en distintos órganos, abre la posibilidad hacia su empleo en medicina nuclear para la diagnosis de enfermedades del corazón y del páncreas (Ba *et al.*, 2012). Por otro lado, el telurio ha sido empleado en diferentes actividades industriales para la producción de aleaciones metálicas, paneles solares, fabricación de vidrio, en dispositivos electrónicos y en el desarrollo de baterías recargables de nueva generación (Zare *et al.*, 2017).

Sin embargo, todavía no se sabe en profundidad los efectos tóxicos del telurio sobre la salud humana, aunque sí que se ha descrito que la ingesta de este elemento como dióxido de telurio o telurito produce mal alimento, sabor metálico, náuseas y vómitos. Al igual que con el selenio, su toxicidad depende de la forma química, siendo las formas orgánicas de telurio menos tóxicas que las inorgánicas. Asimismo, los aniones TeO_3^{2-} , TeO_4^{2-} presentan mayor toxicidad que el Te^0 , siendo el primero el más tóxico de todos. Además, también se ha descrito que la toxicidad del Te^0 es menor que la del Se^0 en la misma dosis (Wu *et al.*, 2019).

Nanopartículas basadas en telurio (TeNPs).

De la misma manera que ocurría con el selenio, las nanopartículas basadas en telurio (TeNPs) también surgen como nueva forma química de este elemento por su mayor estabilidad, menor toxicidad y por presentar nuevas propiedades, o una mejora en las mismas, con respecto a las formas no nanoestructuradas. En este sentido, se ha descrito la síntesis de nanopartículas con morfología esférica, de hilos y varillas de Te^0 o de TeO_2 , y de composición mixta Te/TeO_2 dependiendo del método de síntesis utilizado. Los más empleados para ello son, de nuevo, los procesos químicos de reducción y la síntesis biogénica mediante el empleo de distintos tipos de bacterias (Figura 12) (Zare *et al.*, 2017; Arab *et al.*, 2016).

Además de sus aplicaciones en el campo de la electrónica y para la fabricación de paneles solares, cabe destacar su posible empleo en el campo de la medicina como agentes antimicrobianos y anticancerígenos. En la Tabla 6 se indican algunos ejemplos encontrados en la literatura científica sobre los métodos empleados para la síntesis de nanopartículas basadas en telurio, así como las aplicaciones para las que han sido desarrolladas.

Tabla 6. Métodos empleados para la síntesis de TeNPs y sus aplicaciones

Nanoestructuras de Te	Método de síntesis	Aplicación	Referencia
Hilos	Reducción	Terapia selectiva contra el cáncer. Producen muerte de células cancerígenas por apoptosis y autofágica independiente de caspasas sin afectar a las células sanas.	Wu <i>et al.</i> 2019
Varillas	Hidrotermal	Agente antioxidante y anticancerígeno con baja toxicidad en células sanas.	Huang <i>et al.</i> 2016
Varillas	Biogénico	TeNPs sintetizadas a partir de bacterias aisladas de aguas residuales para la biorremediación de metales	Nguyen <i>et al.</i> 2019
Varillas y cubos	Reducción	Síntesis de TeNPs empleando extractos de cítricos. Propiedades antimicrobianas frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> . Efecto citotóxico frente a células de melanoma humano.	Medina <i>et al.</i> 2019
Esferas	Sonoquímico	Síntesis de TeNPs asistida por ultrasonidos para su empleo en paneles solares	Mousavi-Kamazani <i>et al.</i> 2017
Varillas	Biogénico	Síntesis de TeNPs mediante <i>Bacillus</i> sp.BZ con efecto antimicrobiano sobre <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Klebsiella pneumonia</i>	Zare <i>et al.</i> 2012
Varillas	Biogénico	TeNPs sintetizadas mediante <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> con propiedades antibacterianas frente a <i>S.aureus</i> y capacidad antioxidante	Shakibaie <i>et al.</i> 2017
Esferas	Biogénico	Síntesis de TeNPs mediante bacterias aisladas de muestras ambientales presentan efecto antimicrobiano frente a <i>E. coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	Figueroa <i>et al.</i> 2018

5. Detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas metálicas/metaloides en matrices complejas.

La presencia de nanopartículas en productos de consumo se está incrementando. Como se ha comentado en esta memoria, para garantizar la seguridad del consumidor es necesario desarrollar marcos legislativos que regulen la adición de nuevos componentes o ingredientes a los productos. Sin embargo, esta tarea se torna en casi imposible si no se

dispone de técnicas analíticas robustas y fiables que permitan detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas en matrices complejas. Asimismo, disponer de este tipo de herramientas también es de vital importancia para comprender la actividad, transporte, destino y toxicidad de las nanopartículas, tanto en el organismo como en los diferentes ecosistemas. Una vez que las nanopartículas son liberadas, tras su ciclo de vida útil, se pueden metabolizar y degradar en diferentes formas y especies. La caracterización y cuantificación de nanomateriales en matrices complejas supone un gran reto analítico por tres motivos principales. El primero de ellos está relacionado con la necesidad de emplear técnicas analíticas con límites de detección muy bajos, ya que en general las nanopartículas suelen encontrarse a niveles de concentración desde mg L^{-1} a ng L^{-1} . Además, el hecho de que las nanopartículas puedan sufrir transformaciones en las diferentes matrices puede conducir a la distribución de las mismas en partículas de distintos tamaños, o en forma iónica como consecuencia de procesos de disolución. Esto tiene como consecuencia que se requieran límites de detección y/o cuantificación aún más bajos que los necesarios para determinar su concentración total. El segundo motivo estaría relacionado con las posibles transformaciones que las nanopartículas pueden sufrir en muestras biológicas o medioambientales, entre ellas disolución (disminución del tamaño de partícula y liberación de iones metálicos), aglomeración y/o funcionalización, que a menudo dificultan su análisis. Por último, es requisito imprescindible preservar la integridad de las propiedades de la nanopartícula durante el proceso de análisis para evitar obtener información errónea, por ejemplo, del tamaño de partícula o de su concentración en forma particulada y/o disuelta (Laborda *et al.*, 2016a; Laborda *et al.*, 2016b; Lopez-Sanz *et al.*, 2019).

Las dificultades comentadas anteriormente, junto con la gran variedad de parámetros tanto cualitativos como cuantitativos que hay que determinar para identificar, caracterizar y cuantificar las nanopartículas de manera unívoca, hacen que sea necesario el empleo de varias técnicas analíticas complementarias. Esto permitirá obtener información precisa y detallada sobre la composición química de la nanopartícula, su tamaño o distribución de tamaños, su morfología, su estado de agregación y su estructura cristalina. En la Figura 14 se muestra el tipo de información requerida para conocer el comportamiento de las nanopartículas en diferentes medios o matrices, y las técnicas analíticas que han demostrado ser las más adecuadas para el estudio de estas propiedades (Laborda *et al.*, 2016b).

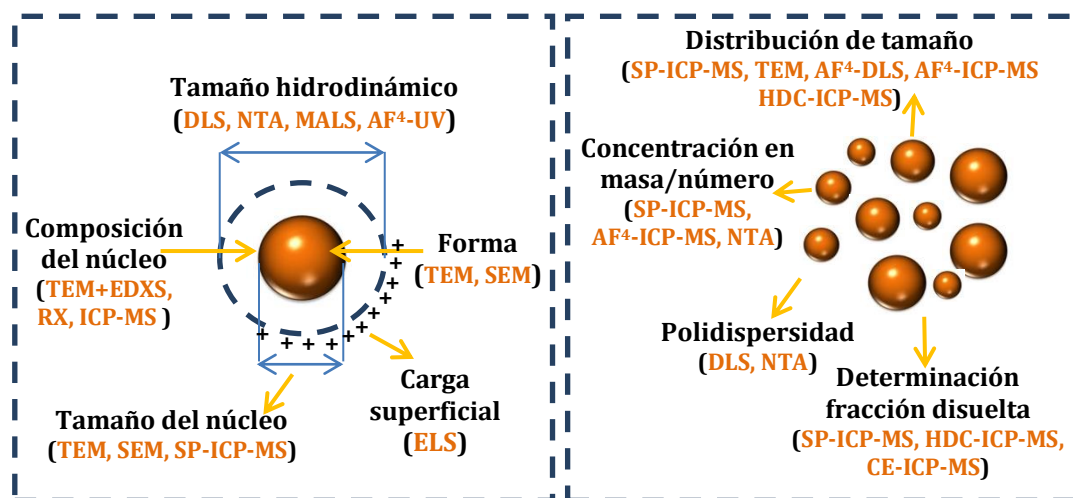


Figura 14. Información proporcionada por las técnicas analíticas más empleadas para la caracterización de nanopartículas.

A continuación, se ofrece una descripción general de las técnicas analíticas más aplicadas para la caracterización, identificación y cuantificación de nanopartículas en matrices complejas.

5.1. Técnicas de microscopía electrónica.

Las técnicas de microscopía electrónica son las más empleadas para la caracterización de nanopartículas metálicas/metaloideas y de sus correspondientes óxidos, debido a que permiten la visualización de su núcleo metálico y, por tanto, la obtención de información acerca de su tamaño, morfología y estado de agregación. Asimismo, su acoplamiento a técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDXS, Energy-Dispersive X-rayspectroscopy), permite conocer la composición elemental de la nanopartícula (Laborda *et al.*, 2016b).

Las modalidades más empleadas dentro de la microscopía electrónica son la microscopía electrónica de transmisión (TEM, Transmission Electron Microscopy), la microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) y la microscopía de fuerza atómica (AFM, Atomic Force Microscopy). Cuando los electrones interactúan con la superficie del material, estos pueden transmitirse, dispersarse o difractarse. En el caso de la técnica TEM, los electrones transmitidos se emplean para obtener una proyección bidimensional que dependerá del espesor de la muestra. Sin embargo, en la técnica SEM los electrones dispersados proporcionan una imagen en 3D de la superficie del nanomaterial bombardeado con el haz de electrones (Kranz *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2014).

A pesar de las ventajas que ofrece la microscopía electrónica, es una técnica destructiva tanto por la forma de preparar la muestra como por el daño ocasionado al

incidir el haz de electrones sobre la misma. Asimismo, se necesita la aplicación de una etapa previa de preparación de la muestra para poder trabajar en las condiciones de vacío requeridas por ambas técnicas. Esta suele implicar la dispersión del material en un disolvente orgánico que no afecte a las propiedades de las mismas, y la deposición de una gota de dicha dispersión sobre una rejilla en la que se evaporará el disolvente donde se encuentre dispersa la muestra. Además, en la técnica SEM la muestra tiene que ser conductora en su superficie, por lo que habitualmente se deposita una película conductora sobre esta. El proceso de preparación de la muestra puede originar modificaciones en las propiedades originales de las partículas, puesto que al llevar la dispersión a sequedad se produce un aumento en la concentración de las partículas y solutos con la consiguiente agregación de las mismas y la posible precipitación de sales. Por otro lado, ambas técnicas requieren la adquisición de un número elevado de imágenes con el fin de obtener un número estadísticamente significativo de partículas, ya que presentan una baja resolución espacial. Asimismo, las nanopartículas objeto de estudio deben encontrarse a niveles de concentración relativamente elevados con el fin obtener observaciones que sean representativas (Tiede *et al.*, 2008; Lopez-Sanz *et al.*, 2019).

A pesar de los inconvenientes citados, las técnicas de microscopía electrónica, en concreto la técnica TEM, aparece en las directrices de la EFSA como técnica recomendada para la evaluación de los riesgos asociados al empleo de la nanociencia y la nanotecnología en la cadena alimentaria (EFSA, 2018). En concreto, en esta guía se especifica que es necesario el empleo de más de una técnica analítica para elucidar las propiedades de las nanopartículas en las matrices alimentarias, estableciendo que una de ellas debe de ser la técnica TEM.

Por último, cabe destacar que la técnica AFM permite analizar las muestras tanto en forma sólida como en dispersión bajo condiciones ambientales, obteniéndose también perfiles superficiales en 3D. Sin embargo, todavía se desconoce si realmente el análisis de las partículas en estas condiciones proporciona información más fiable que las técnicas SEM y TEM que operan a vacío. Por otro lado, hay que tener en consideración que el recubrimiento de alguno de los componentes del microscopio con materia orgánica procedente de las disoluciones puede también llevar a resultados erróneos (Klapetek *et al.*, 2016).

5.2. Difracción de rayos X.

La difracción de rayos X se considera una técnica muy útil para la caracterización de nanopartículas por dos razones principales: es una técnica no destructiva y, por otro

lado, el hecho de que la longitud de onda del haz de rayos X sea del orden de los nanómetros (entre 0.1 y 10 nm) hace que sea adecuada para la caracterización de materiales a escala atómica. El haz de rayos X incide en las nanopartículas con un ángulo determinado (ángulo Θ). Como consecuencia, se generan rayos X difractados que se colectan a un ángulo 2Θ que depende de la distancia entre los planos que componen su estructura cristalina. Esta técnica permite identificar la composición elemental de un nanomaterial, sus fases cristalinas y estimar la forma y el tamaño medio de las mismas (Sharma *et al.*, 2012).

5.3. Técnicas de dispersión de la luz.

Las técnicas de dispersión de luz proporcionan información sobre parámetros físico-químicos de las nanopartículas en dispersión, como el diámetro hidrodinámico o el potencial zeta. Las técnicas de dispersión de luz más empleadas son: la dispersión de luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering), la dispersión de luz electroforética (ELS, Electrophoretic Light Scattering) y la dispersión multiángulo de luz láser (MALS, Multi-angle Laser Light Scattering) (Laborda *et al.*, 2016b). Entre ellas, la técnica DLS es la más utilizada para medir el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en dispersión, lo que implica, no solo conocer el tamaño del núcleo metálico de estas, sino también la de la doble capa eléctrica formada alrededor de la partícula por estar en suspensión. El movimiento Browniano de las partículas en suspensión, como consecuencia de los procesos de difusión de las mismas, hace que la luz se disperse en diferentes intensidades. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional. De esta manera, la técnica DLS mide las fluctuaciones temporales de la intensidad de la luz dispersada, a partir de lo que se determina este coeficiente de difusión traslacional, pudiéndose asociar con el tamaño de partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1):

$$D = \frac{K_B \times T}{6 \times \pi \times \eta \times r} \quad (1)$$

donde, K_B es la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad del fluido y r el radio hidrodinámico de las partículas.

Aunque esta técnica permite obtener información tan importante para la caracterización de las nanopartículas en dispersión como el radio hidrodinámico, la presencia de partículas de gran tamaño o muestras con partículas con distribuciones de tamaño muy heterogéneas, puede dar lugar a resultados erróneos. Esto es debido, principalmente, a que esta técnica es incapaz de detectar la presencia de partículas

pequeñas entre las más grandes, dando lugar a información sobre la distribución de tamaños y valor de tamaño medio poco fiable. El acoplamiento de esta técnica a otras técnicas que permitan una separación previa de las nanopartículas por tamaños puede solventar los problemas asociados a la polidispersidad de la muestra (Tiede *et al.*, 2008; Brar *et al.*, 2011; Mourdikoudis *et al.*, 2018).

Otra alternativa basada en la dispersión de luz es la técnica MALS, frecuentemente empleada como detector de técnicas de separación para el análisis de coloides y de nanopartículas. Esta metodología permite la determinación de masas moleculares, por lo que constituye una herramienta muy útil para conocer también el tamaño de la partícula. Además, no requiere el empleo de una calibración previa con sustancias de tamaño conocido, lo que supone una gran ventaja teniendo en cuenta la escasez de patrones de referencia en el campo de las nanopartículas (Hagendorfer *et al.*, 2012; Ulrich *et al.*, 2012).

Por otro lado, otro de los parámetros de relevancia a la hora de caracterizar nanopartículas en suspensión es el potencial zeta. Este parámetro se deduce a partir de la movilidad electroforética de las nanopartículas en un campo eléctrico, proporcionando información sobre la magnitud de la repulsión o atracción entre las mismas. De esta manera, el potencial zeta indica la carga superficial de una partícula y el grado de agregación de las partículas en suspensión. En este sentido, valores de potencial zeta menores de -30 mV y mayores que 30 mV indican dispersiones estables, sin embargo, cuando dichos valores se encuentran dentro de este intervalo quiere decir que las fuerzas de repulsión no son lo suficientemente fuertes para evitar la agregación de las partículas. Las medidas de potencial zeta se suelen llevar a cabo mediante la técnica de dispersión de luz electroforética (ELS) (Jiang *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2012).

Finalmente, el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, Nanoparticle Tracking Analysis) se basa en el seguimiento del movimiento browniano de un número estadísticamente significativo de partículas individuales, a partir del cual se calcula sus diámetros hidrodinámicos mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1). La dispersión de la luz por las partículas en suspensión se observa a través de un microscopio con una cámara de video, lo que permite visualizar las nanopartículas como puntos de dispersión de la luz. Además de proporcionar información sobre el radio hidrodinámico, esta técnica también permite conocer la concentración de las mismas en número de partículas. La técnica NTA presenta mayor resolución y menor vulnerabilidad frente a la presencia de nanopartículas de gran tamaño o agregados en comparación con la técnica DLS. Asimismo, también es más efectiva para el análisis de muestras polidispersas. Sin

embargo, no proporciona información fiable del diámetro hidrodinámico de las partículas con un tamaño menor de 20 nm (Gallego-Urrea *et al.*, 2011; Laborda *et al.*, 2016).

5.4. Técnicas de separación.

Las técnicas de separación tanto cromatográficas como no cromatográficas se han empleado para la caracterización de nanopartículas metálicas. Dentro de las primeras cabe destacar las técnicas basadas en cromatografía de alta resolución, y dentro de las segundas, el fraccionamiento por campo de flujo asimétrico, las técnicas de ultrafiltración y la extracción por punto de nube.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Dentro de los métodos cromatográficos de alta resolución, los más frecuentes para la caracterización de nanopartículas son la cromatografía hidrodinámica (HDC, Hydrodynamic Chromatography) (Tiede *et al.*, 2009; Rakcheev *et al.*, 2013; Proulx *et al.*, 2014) y la cromatografía de exclusión por tamaños, (SEC, Size-Exclusion Chromatography) (Krueger *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2014; Pitkanen *et al.*, 2016). Aunque en menor medida, también se han utilizado la cromatografía en fase inversa (RPC, Reverse Phase Chromatography) y la cromatografía de intercambio iónico (IEC, Ionic Exchange Chromatography) para el mismo propósito (Helfrich *et al.*, 2011; Hanley *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

La combinación de estas técnicas con distintos detectores ha permitido la resolución de sistemas complejos que contienen nanomateriales, sin embargo, se han observado ciertas limitaciones en los métodos desarrollados, debido principalmente a factores como la baja resolución en la separación, la modificación de la integridad original de las nanopartículas debido a las altas presiones, y las adsorciones inespecíficas de las partículas sobre la fase estacionaria (Rebolj *et al.*, 2012; Kreyling *et al.*, 2015).

Fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF).

El fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) es una familia de técnicas que se basan en la aplicación de un campo externo perpendicular a un flujo laminar. Según la naturaleza del campo externo aplicado, se diferencian distintas subtécnicas: FFF térmico (ThFFF), FFF de sedimentación (SdFFF), FFF de flujo (FlFFF), FFF eléctrico (ElFFF) y FFF magnético (MgFFF) (Contado, 2017). Este conjunto de técnicas permite la separación y caracterización de materiales de un amplio intervalo de tamaños (desde 1 nm a 100 μ m).

De entre las diferentes modalidades de FFF, la técnica que se considera más universal hasta la fecha para la caracterización de nanopartículas, es una variante del FIFF, que se denomina de flujo asimétrico (AF^4 o AsFIFFF). En AF^4 el campo externo aplicado es un flujo secundario, que se conoce como flujo cruzado o *crossflow*, el cual atraviesa perpendicularmente el flujo conductor del sistema que circula en régimen laminar (flujo laminar) a través del canal de separación. De esta manera, las partículas, que entran en este flujo laminar son arrastradas por el campo externo (flujo cruzado) hacia la base del canal de separación o pared de acumulación, desde donde se desplazan en sentido opuesto al campo aplicado (Figura 15) (Moreno-Martin *et al.*, 2017b).

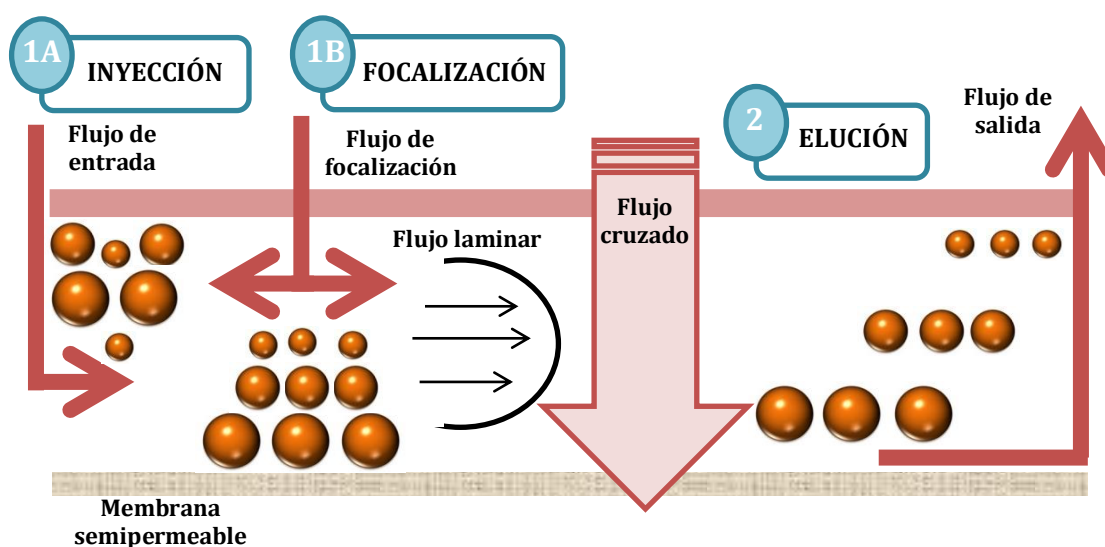


Figura 15. Mecanismo y etapas implicadas en la separación mediante AF^4 .

La pared de acumulación está formada por una membrana semipermeable colocada sobre un soporte poroso que permite la circulación del flujo cruzado (Figura 15) (Moreno-Martin *et al.*, 2017b).

Por tanto, el equilibrio entre la fuerza del campo externo generado y la fuerza opuesta que ejercen las partículas impulsadas por el flujo conductor es el responsable de la separación de las mismas, ya que va a hacer que estén retenidas un tiempo determinado en función del tamaño de partícula. En este sentido, se pueden diferenciar dos etapas en el proceso de separación: una primera etapa de inyección y focalización de la muestra, donde la muestra se concentra en una zona estrecha mediante la aplicación de los dos flujos opuestos, hasta que alcanzan su posición de equilibrio; y una segunda etapa de elución en la que se produce la separación de la muestra cuando se deja de aplicar el flujo de focalización (Figura 16) (Schimpf *et al.*, 2000; Moreno-Martín *et al.*, 2017b).

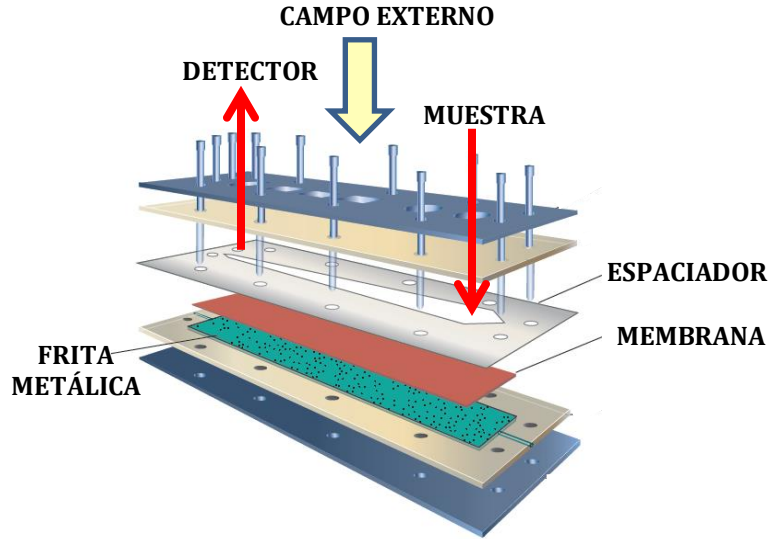


Figura 16. Esquema del módulo de AF⁴ donde se lleva a cabo la separación. Adaptación de Moreno-Martin *et al.*, 2017b.

La etapa de elución puede producirse de dos formas en función del tamaño de partícula y grado de polidispersidad de la muestra. Una de ellas es el modo normal o Browniano donde las partículas de menor tamaño son las primeras en eluir frente a las de mayor tamaño, por ser un proceso controlado por fenómenos de difusión. En el caso de un modo de elución estérico, en el que el proceso está controlado prácticamente por fuerzas de repulsión entre las partículas y la membrana, las partículas de mayor tamaño eluyen antes que las más pequeñas. Este segundo modo de elución suele darse cuando el tamaño de partícula es grande (del orden de las micras) (Von Der Kammer *et al.*, 2011). También puede suceder que las dos modalidades de elución coexistan provocando que nanopartículas de diferente tamaño coeluyan. Esto último es propio de suspensiones polidispersas que presentan un amplio rango en la distribución de tamaños (Dou *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2018).

El tiempo de retención de las especies se puede relacionar con el radio hidrodinámico de las partículas a través de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1) y la de la teoría FFF (Ecuación 2):

$$t_R = \frac{W^2}{6 \times D} \times \ln \left(1 + \frac{F_c}{F_{out}} \right) \quad (2) \quad D = \frac{K_B \times T}{6 \times \pi \times \eta \times r} \quad (1)$$

donde, t_R es el tiempo de retención, W el espesor del canal, D el coeficiente de difusión de las partículas, F_c el flujo cruzado aplicado, F_{out} el caudal de salida del canal, K_B la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad del fluido y r el radio hidrodinámico de las partículas.

Según las ecuaciones indicadas, cuanto menor es el tamaño de una especie, mayor es su coeficiente difusión y, por tanto, menor es el tiempo de retención de la misma. De igual modo, el tiempo de retención depende de la relación F_c/F_{out} por lo que valores más altos de flujo cruzado conllevan mayores tiempos de retención. Por lo general, valores de F_c elevados son requeridos para la separación de partículas pequeñas. Sin embargo, el hecho de emplear caudales de flujo cruzado elevados tiene el inconveniente de que los tiempos de retención son mayores, originándose un ensanchamiento de los picos y pérdidas selectivas de las partículas más grandes de la muestra. Además del flujo cruzado, también es necesario optimizar otro tipo de parámetros como son la composición del flujo portador, el material y el tamaño de poro de la membrana, o las dimensiones del canal. Otras condiciones como el pH, la fuerza iónica y la composición química de la disolución portadora también merecen especial atención, puesto que van a influir en las propiedades electrostáticas de la membrana y de las partículas, condicionando así la interacción entre ambas (Moreno-Martin *et al.*, 2017b).

El parámetro que permite cuantificar la eficiencia de separación resultante de las interacciones electrostáticas entre partículas y membrana es la **recuperación del analito** (relación entre la cantidad del analito eluido y la cantidad del analito inyectado). La recuperación se calcula en la mayoría de los casos realizando la separación en ausencia y presencia de flujo cruzado. El cálculo de este parámetro es de especial importancia para llevar a cabo análisis cuantitativos en AF⁴, puesto que recuperaciones bajas pueden indicar pérdidas de analito a través de la membrana o procesos de adsorción en la superficie de la misma, lo que implica un comportamiento de elución no ideal en la mayor parte de los casos (Loeschner *et al.*, 2013; Meisterjahn *et al.*, 2016).

La determinación del radio hidrodinámico se puede calcular a través de las ecuaciones anteriores o mediante el uso de sustancias patrón de tamaño. En este sentido, el empleo de compuestos de tamaño conocido permite relacionar los tiempos de retención de los analitos con los de los patrones, obteniéndose así información sobre su tamaño. Lo ideal es emplear patrones de la misma composición y propiedades físico-químicas que los analitos de la muestra, para que su interacción con la membrana sea similar. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones esto no es posible debido a la escasez de patrones certificados de nanopartículas. Por ello es muy frecuente el empleo de patrones comerciales de partículas de látex de tamaño certificado o nanopartículas de oro y de plata (Palomo *et al.*, 2017a).

Una de las grandes ventajas de esta técnica es su versatilidad para ser acoplada a distintos detectores, siendo los más comunes DLS, MALS, UV-Vis e ICP-MS (Bednar *et al.*, 2013). Estos acoplamientos han permitido la separación, caracterización y cuantificación de nanopartículas de Ag, Au, Se, SiO₂, TiO₂ o ZnO en muestras de alimentos, productos de consumo y muestras biológicas y ambientales (Reschiglian *et al.*, 2011; López-Heras *et al.*, 2014b; Meisterjahn *et al.*, 2014; Laborda *et al.*, 2016; De la Calle *et al.*, 2018). Sin embargo, la técnica AF⁴ no es capaz de aportar información sobre la posible presencia de iones procedentes de la disolución de las nanopartículas, puesto que, a diferencia de las nanopartículas, los iones atraviesan la membrana semipermeable y no se retienen en la misma. Esta desventaja puede convertirse en una ventaja si el AF⁴ se aplica para la eliminación de la fracción disuelta como técnica previa a la aplicación de técnicas como SP-ICP-MS (single particle-ICP-MS) que comentaremos posteriormente (Hetzer *et al.*, 2017).

Los procesos de ultrafiltración y diálisis, y los procesos de extracción en punto de nube también permiten la separación, en este caso, de la fracción disuelta de la particulada en una dispersión de nanopartículas. Entre las técnicas citadas, la ultrafiltración (UF) y la extracción en punto de nube (CPE, Cloud Point Extraction) son las más utilizadas (Jin-Fu *et al.*, 2009; Fabricius *et al.*, 2014).

La UF es una técnica basada en el uso de membranas de diferente tamaño de poro por la que, al aplicar una fuerza centrífuga, pasarán las especies de tamaño o masa molecular inferior al tamaño de poro de la membrana. Además, el análisis por ICP-MS de las fracciones obtenidas proporciona información sobre las especies presentes en cada una de ellas, así como la determinación de su composición elemental y su cuantificación. Los procesos de diálisis también están basados en el uso de una membrana que, a diferencia de la técnica anterior, el paso selectivo de las especies se basa en gradientes de concentración. Este método también se utiliza para la purificación de las nanopartículas sintetizadas y para realizar cambios de disolvente con respecto al disolvente en el que se encuentran disueltas (Odzak *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2017; Markus *et al.*, 2018).

Por otro lado, la CPE está captando numerosos adeptos en los últimos años por permitir de manera sencilla la separación de nanopartículas metálicas de sus especies iónicas. Esta técnica se basa en la transferencia de un analito desde una fase líquida a otra, utilizando un tensioactivo no iónico mediante un calentamiento de la disolución. En este sentido, el *cloud point* es la temperatura a la cual una disolución acuosa, en presencia de un tensioactivo, se separa en dos fases: una rica en el propio tensioactivo y otra fase

donde la concentración del tensioactivo es cercana a la concentración micelar crítica. Aquellas especies capaces de interaccionar con las micelas pasarán por tanto a la fase concentrada rica en el tensioactivo, produciéndose así la separación entre la fracción disuelta y la particulada (Yang *et al.*, 2016; Torrent *et al.*, 2019). Esta técnica también se ha empleado como etapa para la eliminación de la fracción disuelta previo al análisis de nanopartículas por SP-ICP-MS (Hadri *et al.*, 2017).

Finalmente, cabe destacar que las técnicas de separación electroforéticas, como la electroforesis capilar (CE, Capillary Electrophoresis) acoplada a UV-Vis o ICP-MS, también constituyen una alternativa muy eficaz a las técnicas de separación por cromatografía de alta resolución o por fraccionamiento en campo de flujo descritas en este apartado, para el análisis de nanopartículas metálicas en muestras alimentarias, biológicas y/o medioambientales (Qu *et al.*, 2014; Mebert *et al.*, 2016; Adam & Vaculovicova, 2017; Qu *et al.*, 2017).

5.5. Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) para el análisis de nanopartículas. Single particle-ICP-MS.

A pesar de las ventajas que ofrece la técnica ICP-MS para el análisis de nanopartículas (composición y/o concentración en masa), no es capaz de proporcionar de forma directa información sobre el tamaño de las nanopartículas, ni tampoco establecer si estas están presentes como especies disueltas o particuladas. Sin embargo, existe una modalidad de trabajo donde toda esta información puede ser adquirida si se utiliza el ICP-MS en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS, Single-Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

La detección individual de nanopartículas mediante ICP-MS (SP-ICP-MS) fue explorada y desarrollada por primera vez a principios del 2000 por Degueldre & Favarger (Degueldre & Favarger, 2003; Degueldre & Favarger, 2004; Degueldre & Favarger, 2006). Sin embargo, no fue hasta el año 2010 donde se consolidó como técnica para el análisis de nanopartículas. Desde entonces y hasta ahora, no han dejado de crecer el número de estudios que utilizan dicha técnica para la detección y caracterización de nanomateriales en una gran variedad de muestra. Las ventajas de esta técnica que explican su gran aplicabilidad son: la relativa sencillez del análisis que puede llevarse a cabo en cualquier equipo de ICP-MS comercial, y la relevancia de la información que se puede obtener a niveles de concentraciones de ng L⁻¹. En un solo análisis, y tras el procesamiento de los datos adquiridos, se puede obtener información cuantitativa sobre la fracción disuelta o particulada de uno o más elementos, el tamaño de las partículas (si se conoce su

composición, morfología y densidad), el contenido en masa del elemento por partícula, la distribución en masa por partícula y/o tamaño y la concentración en número de partículas (partícula L⁻¹) y en masa (ng L⁻¹) tanto de la forma disuelta como de la particulada (Abad-Alvaro *et al.*, 2016).

La técnica SP-ICP-MS se basa principalmente en el comportamiento que tiene el analito en el plasma en función de si está presente en la muestra en forma disuelta o particulada. Mientras que las especies disueltas están distribuidas homogéneamente en la disolución y, por tanto, también dentro de las gotas de aerosol, las nanopartículas en suspensión, al no estar homogéneamente distribuidas, estarán presentes en el aerosol como un grupo discreto de átomos y solo en una pequeña fracción de las gotas. De esta manera, en el caso de las especies disueltas, la masa del elemento que entra en el plasma por unidad de tiempo puede considerarse constante, produciendo una señal estable durante el tiempo de adquisición (Figura 17a). En cambio, en el caso de una disolución que contenga nanopartículas en suspensión, su ionización en el plasma generará un paquete de iones que serán detectados por el espectrómetro como pulsos o eventos (Figura 17 b) (Laborda *et al.*, 2016a).

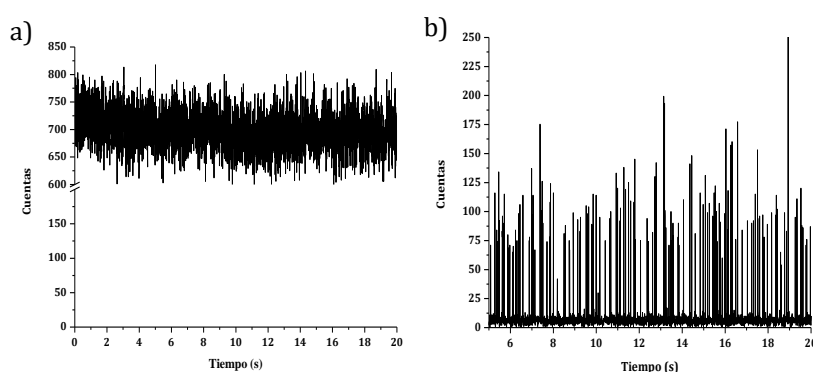


Figura 17. Señal instrumental procedente de SP-ICP-MS en función de la forma del elemento (a) disuelta (patrón de Au para ICP-MS) y (b) particulada (patrón de AuNPs LGC5050 30 nm).

De esta manera, las partículas individuales se registran como eventos discretos sobre una línea base continua, que es debida a la señal de fondo originada por especies poliatómicas procedentes del plasma y/o la matriz, o por la presencia de especies disueltas liberadas de las nanopartículas analizadas (Figura 17b). En este sentido, el número de pulsos o eventos sobre la línea base es proporcional al número de partículas presentes en la muestra, y por tanto proporciona información sobre la concentración en número de partículas. Sin embargo, la intensidad de los pulsos está relacionada con la masa del analito, que a su vez puede proporcionar información sobre el tamaño de la nanopartícula si se conocen otras propiedades de la misma como son su densidad y

morfología. Por otra parte, la intensidad de la señal de fondo constante que proporcionan los iones liberados de las partículas, puede ofrecer información cuantitativa de la fracción disuelta de la partícula mediante el empleo de estrategias de calibración externa (Laborda *et al.*, 2013).

Para poder trabajar correctamente en modo SP-ICP-MS se requiere utilizar suspensiones de nanopartículas a concentraciones en número lo suficientemente bajas para evitar detectar eventos múltiples en un solo pulso. La presencia de estos eventos múltiples implica un error sistemático en los resultados al ser considerados como eventos producidos por una sola partícula. Como consecuencia de esto, para conseguir que la probabilidad de detectar dos o más partículas simultáneamente sea casi despreciable, los factores de dilución aplicados a las muestras son muy elevados. Además, la dilución de la muestra también conlleva la disminución de interferencias debida a la matriz de la misma, por lo que esta técnica es muy adecuada para el análisis de nanopartículas en muestras con matriz compleja (Peters *et al.*, 2015).

Por otro lado, además de utilizar suspensiones de partículas a muy baja concentración es necesario el empleo de frecuencias de adquisición de datos elevadas. La frecuencia de adquisición de datos está gobernada de manera directa por el tiempo de estancia o tiempo de lectura (t_{dwell}), por el tiempo de asentamiento (*settling time*) y, de manera indirecta, por la capacidad del instrumento para la transmisión y el almacenamiento de datos al ordenador. El t_{dwell} es el tiempo utilizado en la adquisición de datos para una masa atómica específica mientras que el tiempo de asentamiento tiene que ver con el tiempo empleado para la estabilización del cuadrupolo, una vez que cambia de una masa atómica a otra. En los antiguos espectrómetros de masas de cuadrupolo los tiempos de lectura estaban limitados al rango de los milisegundos, por lo que solo era posible monitorizar un elemento/isótopo por partícula. Cuando se trabaja en el rango de los milisegundos lo más común es utilizar tiempos de lectura entre 3 y 10 ms, y concentraciones en número de partícula por debajo de 10^8 part L^{-1} . Sin embargo, con el desarrollo de instrumentos de cuadrupolo más sofisticados, se pueden llevar a cabo barridos en modo ultrarrápido, trabajando en el rango de los microsegundos. En este caso, lo más común es utilizar tiempos de lectura entre 100-10 μs lo que permite detectar hasta dos elementos/isótopos en la misma partícula (Abad-Alvaro *et al.*, 2016). Una de las diferencias más evidente entre los dos rangos de tiempo de lectura es que al trabajar en microsegundos, las partículas se registran como señales transitorias en lugar de como pulsos en el caso de los milisegundos (Figura 18). Esto permite trabajar con mayores concentraciones de nanopartículas sin que se produzcan solapamientos de señales, lo que

hace que los análisis sean mucho más precisos independientemente del tiempo de lectura siempre que estén entre 100-10 μ s. Además, los límites de detección en tamaños están menos afectados por la presencia de especies disueltas o la señal de fondo cuando se trabaja en el rango de los microsegundos (Abad-Alvaro *et al.*, 2016).

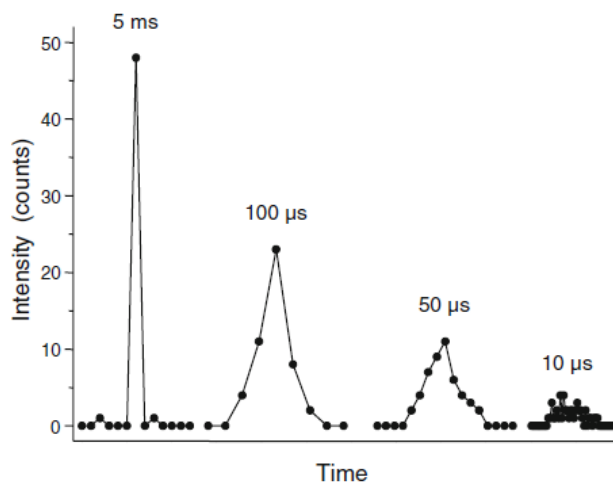


Figura 18. Señales obtenidas mediante SP-ICP-MS en función del tiempo de lectura utilizado. Imagen tomada de Abad-Alvaro *et al.* 2016

Por otro lado, cabe destacar que el procesamiento de las señales obtenidas tras el análisis por SP-ICP-MS también es diferente en función de si se ha realizado con tiempos de lectura del orden de los milisegundos o de los microsegundos. En el primer caso, el procesamiento de las señales consiste en la aplicación de una serie de algoritmos para discriminar las señales correspondientes a eventos de nanopartículas frente a aquellas debidas a la línea base (señal de fondo y/o de las especies disueltas). En este sentido, Pace *et al.*, desarrollaron un algoritmo iterativo basado en un criterio 3σ (σ es la desviación estándar de todo el conjunto de datos) con el fin de diferenciar entre la señal procedente de la línea base y la correspondiente a las partículas (Pace *et al.*, 2011). Sin embargo, Touriniemi *et al.*, propusieron un criterio 5σ para asegurar que la contribución de eventos contados erróneamente como debidos a nanopartículas fuera menor del 0.1 % del total de eventos registrados (Tuoriniemi *et al.*, 2012). Establecer el límite entre la señal debida a la línea base y la debida a las partículas es uno de los aspectos claves en el análisis mediante SP-ICP-MS. En el caso de los microsegundos, una vez que las señales transitorias debidas a nanopartículas son identificadas sobre la línea base continua, estas se integran de manera similar a un pico obtenido en un cromatograma.

Una vez procesada las señales, es necesario aplicar una serie de ecuaciones matemáticas para poder calcular la concentración en número de partícula y el tamaño de partícula. Estas ecuaciones matemáticas se fundamentan en la base teórica sobre la que se sustenta la técnica SP-ICP-MS que fue descrita por Degueldre y Favarger, y sintetizada por

Laborda et al., (Delgueldre & Favarger, 2003; Degueldre & Favarger, 2004; Degueldre & Favarger, 2006; Laborda *et al.*, 2013; Laborda *et al.*, 2014; Laborda *et al.*, 2016a). Como ya se ha mencionado anteriormente, el número de eventos contados (N_p) durante un tiempo de adquisición (t_i) determinado es proporcional a la concentración en número de partículas (C_p), siempre y cuando cada uno de los evento registrados sea equivalente a una sola partícula. Esta relación puede expresarse mediante la siguiente ecuación (Ecuación 3):

$$N_p = \eta_{neb} Q_{sam} t_i C_p \quad (3)$$

donde η_{neb} es el rendimiento de nebulización y Q_{sam} es el caudal de introducción de muestra.

Por otra parte, intensidad de cada evento (r_p) es proporcional al número de átomos por partícula y, por tanto, a la masa de la partícula (mp) (Ecuación 4):

$$r_p = K_{ICPMS} K_M m_{pi} \quad (4)$$

donde K_{ICPMS} es la eficiencia de detección entendida como la relación entre el número de iones detectados frente al número de átomos introducidos en el ICP; y K_M está relacionado con la abundancia atómica del isótopo monitorizado (A), el número de Avogadro (N_{AV}) y la masa atómica del elemento (M_m) mediante la ecuación (Ecuación 5):

$$K_M = AN_{AV}/M_m \quad (5)$$

Asimismo, el tamaño de la partícula puede calcularse a partir de la masa de la partícula si se conoce su composición, morfología y densidad. En el caso de nanopartículas esféricas y de composición homogénea, la Ecuación 4 se puede transformar de la siguiente manera para el cálculo del tamaño de partícula (Ecuación 6):

$$r_p = \frac{1}{6} \pi \rho X_p K_{ICPMS} K_M d^3 \quad (6)$$

donde d es el diámetro, ρ es la densidad y X_p la fracción de masa del elemento en la partícula.

Finalmente, como ya se ha mencionado, la detección de las nanopartículas está asociada a la capacidad de identificar los pulsos correspondientes a la misma sobre la línea base, paso clave en el análisis mediante SP-ICP-MS. De acuerdo con esto, la altura del pulso más pequeño que se puede distinguir de la línea base va a determinar la masa de la partícula más pequeña y, a su vez, el tamaño de nanopartícula más pequeño que se puede

detectar. En este sentido, el límite de detección de tamaño (LOD_{size}) se puede establecer mediante la siguiente ecuación (Ecuación 7):

$$LOD_{size} = \left(\frac{18\sigma}{\pi \rho X_p K_{ICPMS} K_M} \right)^{1/3} \quad (7)$$

utilizándose el criterio 3σ , donde σ es la desviación estándar de la señal continua de fondo.

Los límites de detección de tamaño para partículas metálicas suelen ser próximos a los 20 nm, mientras que estos LOD_{size} para nanopartículas de óxidos metálicos suelen variar desde aproximadamente los 30 nm hasta los 200 nm. En el caso de los límites de detección en masa, estos suelen estar alrededor de los 10 atogramos por partícula. Los factores que más incrementa los límites de detección en tamaño de partícula son la presencia de niveles altos de señal de fondo y la presencia de elevadas concentraciones del metal en forma iónica. Esto dificulta notablemente la aplicación de la técnica al análisis de nanopartículas metálicas/metaloides con tendencia a disolverse cuando están dispersas en determinadas matrices (Laborda *et al.*, 2013).

6. Metodologías analíticas para la evaluación de los efectos biológicos producidos por nanopartículas en comunidades bacterianas.

La gran complejidad de los comportamientos cooperativos que se dan en las comunidades bacterianas, y el elevado número de factores de los que dependen los efectos biológicos producidos por las nanopartículas, requiere de la aplicación de una amplia combinación de técnicas analíticas con el fin de evaluar aspectos como el efecto biocida, transformaciones o interacción de las nanopartículas en las poblaciones bacterianas. A continuación se describen brevemente algunos de los aspectos que son de mayor interés en este tipo de estudios y las técnicas más comúnmente empleadas.

6.1. Efecto de las nanopartículas en la densidad poblacional bacteriana. Estudios de viabilidad.

La evaluación de la capacidad de las bacterias de crecer en presencia de concentraciones variables de nanopartículas es de vital importancia para establecer el efecto de las nanopartículas sobre procesos dependientes de la densidad poblacional, como puede ser los sistemas de *quorum sensing* y el desarrollo de biopelículas.

Existen diferentes métodos para evaluar el crecimiento microbiano, y no todos ellos proporcionan la misma información. Se van a describir brevemente cada uno de ellos:

***Recuento de colonias en placa:** con este procedimiento se puede determinar el número de células viables en la muestra, es decir, las que pueden dividirse. En este sentido, cada célula o grupo de células viables presentes en la muestra formará colonias separadas en el agar. Cada una de estas colonias es lo que se denomina unidad formadora de colonias (UFC), de manera que las células viables son cuantificadas a través del conteo de estas UFC. Para poder llevar a cabo este procedimiento, el número de colonias no debe de ser muy alto ni tampoco muy bajo para que tenga significado estadístico. Como normalmente no se conoce el número de microorganismos viables, antes de llevar a cabo el conteo, se aplican diluciones seriadas para conseguir que el número de colonias esté en un rango que se considere estadísticamente significativo (generalmente entre 30-300) (Hazan et al., 2012).

***Determinación de la masa celular por turbidez:** también se puede conocer cómo afectan las nanopartículas a la densidad de población mediante la medida de la masa celular. Para ello se puede determinar la turbidez de una suspensión celular mediante turbidimetría utilizando un espectrofotómetro. De esta manera se mide la densidad óptica (DO) de un cultivo bacteriano, es decir, la dispersión de la luz producida por un cultivo, que va a ser proporcional a la masa del cultivo. Este procedimiento no permite diferenciar entre las células viables y no viables (Hazan et al., 2012).

***Citometría de flujo:** La citometría de flujo (FC, Flow cytometry) determina tanto la densidad de población como la viabilidad de las células bacterianas expuestas a las nanopartículas. Esta técnica de análisis celular permite medir las características morfológicas (mediante la dispersión de luz) y antigénicas (mediante la señal de fluorescencia) que poseen las células. Los citómetros de flujo se componen de un sistema hidráulico por donde se introducen las suspensiones celulares, un láser como fuente de excitación para generar la señal luminosa a determinadas longitudes de onda, y un sistema colector que recoge dichas señales para dirigirlas posteriormente a los detectores ópticos. Esta técnica emplea marcadores fluorescentes para poder distinguir entre las células viables (membrana celular íntegra) y no viables (membrana celular dañada). Además de este tipo de información, en función del tipo de marcador empleado, también se pueden obtener datos a diferentes niveles celulares: a nivel molecular (proteínas extracelulares, secuencias de ADN oARN), a nivel subcelular (liposomas, núcleos, cromosomas y otros orgánulos aislados), a nivel celular (células individuales de

microorganismos, animales y vegetales) y a nivel supracelular (organismos pluricelulares y fusiones celulares). También es posible la evaluación de diferentes parámetros en una sola medida si se emplean marcajes múltiples (Breeuwer et al., 2000).

***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa:** se han desarrollado también métodos para el estudio de la viabilidad celular basados en la amplificación de moléculas de ARN siendo la técnica de amplificación más utilizada la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (Jou et al., 1997).

6.2. Empleo de la microscopía electrónica para la evaluación de la internalización y localización intracelular.

Otro de los aspectos claves a la hora de estudiar la interacción y el impacto biológico de las nanopartículas en las células bacterianas es evaluar la internalización y localización de las nanopartículas en el interior celular. En este sentido, el empleo de la microscopía electrónica resulta muy útil para obtener información no solo del destino de las nanopartículas en el interior de las células sino también de los cambios morfológicos o alteraciones producidos en las membranas celulares y/o forma de la célula. La microscopía electrónica de transmisión permite visualizar la localización de las nanopartículas en el interior de las bacterias pudiéndose determinar si estas solamente se adhieren a la superficie o si también son capaces de atravesar la pared celular cuando son puestas en contacto con las poblaciones bacterianas. Asimismo, también se pueden elucidar los posibles cambios en el tamaño y la morfología de las partículas como consecuencia de la interacción bacteria-nanopartícula y el número de partículas internalizadas por las células. Toda esta información permite establecer los posibles mecanismos de interacción y toxicidad que se dan cuando las nanopartículas entran en contacto con las comunidades bacterianas.

Por otro lado, la microscopía electrónica de barrido (SEM) también es una herramienta útil para obtener información sobre la alteración de la morfología y tamaño de células y nanopartículas, sin embargo, no es posible determinar la localización intracelular de las mismas mediante esta técnica.

La preparación de la muestra para realizar este tipo de ensayos biológicos conlleva el empleo de agentes fijadores. Por ejemplo, para preservar la estructura celular se suelen emplear aldehídos, como el glutaraldehído y paraformaldehído, que se unen a los grupos

amino. En la misma línea, también es frecuente el uso de tetraóxido de osmio, que se une a los lípidos insaturados y algunas proteínas, para mejorar la densidad electrónica y, por tanto, el contraste de la imagen.

6.3. ICP-MS como herramienta para el estudio de la acumulación de nanopartículas metálicas /metaloides en células individuales (SC-ICP-MS).

La técnica de ICP-MS se ha empleado frecuentemente para estudios cuantitativos de asimilación y acumulación de nanopartículas metálicas/metaloides y elementos traza en poblaciones de microorganismos. El procedimiento seguido de forma general es la exposición de los cultivos a las nanopartículas o elementos traza durante un tiempo determinado. Transcurrido el periodo de exposición, se procede a la medida del contenido total del elemento en el pellet bacteriano previa digestión ácida del mismo. De esta manera, se determina la concentración de nanopartículas o elementos trazas (en masa total del metal) que una población microbiana puede acumular con respecto al número o masa de células en un tiempo determinado. Sin embargo, este tipo de análisis no tiene en cuenta la variabilidad que puede existir entre células individuales en cuanto a la asimilación de los analitos, y que es inherente como consecuencia de la expresión estocástica de genes (Liu *et al.*, 2019). Este tipo de información se pierde cuando se determina el contenido total de un elemento en una población celular, pues se asume que todas las células captan y acumulan por igual estos elementos.

La evaluación de la asimilación de metales y nanopartículas metálicas/metaloides en células individuales permite obtener información muy útil sobre los mecanismos empleados por los organismos vivos para procesar y acumular dichos elementos. Sin embargo, la dificultad de este tipo de análisis y la falta de metodologías con la que abordar dicha problemática hace que la cuantificación de elementos trazas en células individuales sea todavía un reto analítico.

El creciente interés que han suscitado los análisis a nivel de células individuales ha originado de forma paralela un incremento en el número de estudios que desarrollan nuevas metodologías o introducen mejoras en las ya existentes. Entre ellas, la detección de células individuales mediante SC-ICP-MS (single cell-ICP-MS) se ha posicionado como una de las técnicas emergentes más prometedoras para el análisis cuantitativo de elementos traza y nanopartículas en células individuales de diferentes organismos vivos. La técnica presenta ventajas tales como elevada sensibilidad, sencillez, mínima preparación de la muestra, además de proporcionar información de la heterogeneidad celular dentro de una misma población (Mavrakis *et al.*, 2019).

Las células se comportan en el plasma de forma similar a las nanopartículas, por tanto, la técnica de SC-ICP-MS se sustenta en los mismos principios que la técnica SP-ICP-MS descrita anteriormente (epígrafe 5.5). Mientras que en esta última la intensidad de los eventos es proporcional a la masa de la partícula, y la frecuencia de los pulsos al número de partículas en la muestra, en SC-ICP-MS la intensidad de los eventos proporciona información sobre la masa del analito acumulada en una célula individual, y el número de eventos está relacionado con el número de células que han acumulado el analito en cuestión (Meyer *et al.*, 2018). De esta manera, en un único análisis se puede obtener información sobre cómo se acumula y procesa un determinado elemento en células individuales. Es decir, la masa del analito acumulada por célula, el número de células que acumulan dicho analito y, si se trata de nanopartículas, también se puede determinar el número de nanopartículas acumuladas por célula individual. En este tipo de análisis también se suelen monitorizar elementos constitutivos de las células, como por ejemplo fósforo, magnesio o manganeso, que van a servir como marcadores de las poblaciones celulares (Corte *et al.*, 2017; Lum & Leung, 2019).

Para poder llevar a cabo este tipo de análisis mediante ICP-MS, se han desarrollado sistemas de introducción de muestra que posibilitan que las células individuales lleguen intactas al plasma, para poder así cuantificar con precisión el perfil de asimilación en cada célula. Asimismo, como ocurría en SP-ICP-MS, para las medidas en modo SC-ICP-MS también es necesario introducir cultivos celulares lo suficientemente diluidos para evitar que se detecten eventos múltiples en un solo pulso, y así hacer que cada uno de estos pulsos solo corresponda a una única célula (Corte *et al.*, 2017).

Los estudios que utilizan SC-ICP-MS para análisis de elementos traza a nivel de células individuales son todavía poco frecuentes. Se ha aplicado, por ejemplo, para entender el comportamiento celular en presencia de metales tóxicos o fármacos que contienen metales como principio activo, en estudios de desarrollo de fármacos, para conteos celulares y para elucidar los mecanismos involucrados en la interacción de poblaciones celulares con nuevos agentes químicos, como las nanopartículas. Sin embargo, a pesar de que esta metodología se ha aplicado en células humanas, levaduras y algas (Corte *et al.*, 2017; Lopez-Serrano *et al.*, 2018; Merrifield *et al.*, 2018; Meyer *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Lum & Leung, 2019; Mavrakakis *et al.*, 2019), los estudios en poblaciones bacterianas son casi inexistentes, a pesar de que son organismos modelos cruciales para evaluar, por ejemplo, el impacto de los nanomateriales en el medio ambiente.

6.4. Estudios de especiación para evaluar la biotransformación de nanopartículas metálicas/metaloides en células bacterianas.

Además de conocer los perfiles de acumulación y asimilación de nanopartículas metálicas/metaloides y elementos traza en poblaciones de microorganismos, también es de interés estudiar las especies químicas a las que estas nanopartículas pueden transformarse una vez que interaccionan con las bacterias.

Un ejemplo concreto donde este tipo de estudios tiene especial relevancia es en el caso de la biotransformación de nanopartículas y especies de selenio en bacterias ácido lácticas. Como ya se ha descrito en el apartado 4.1., el desarrollo de alimentos funcionales basados en probióticos enriquecidos en selenio es una alternativa muy prometedora para introducir este elemento esencial en la dieta. Sin embargo, el efecto beneficioso de este tipo de probióticos va a depender de la especie química en la que el selenio sea incorporado al organismo. Por este motivo, el estudio de la biotransformación de especies de selenio por acción de estos microorganismos es primordial para conocer la forma química en la que el selenio se incorpora al organismo, lo que va a condicionar enormemente su biodisponibilidad y, por tanto, la calidad nutricional del alimento producido.

La especiación de selenio, no es una tarea fácil, principalmente debido a que durante el proceso de tratamiento de la muestra se pueden producir transformaciones en las diferentes especies, y además, debido a ello, hasta pérdidas por volatilización de alguna de ellas. Asimismo, la necesidad de emplear técnicas de elevada sensibilidad, la falta de materiales de referencia certificados para la validación de resultados y de patrones comerciales de las diversas especies, dificultan enormemente todo este proceso.

La especiación de selenio consta de cuatro etapas: extracción, separación, identificación y cuantificación (Figura 18). Generalmente, antes del análisis específico de las especies de selenio es imprescindible conocer el contenido total de selenio que se acumula en una determinada especie bacteriana, para poder así determinar qué porcentaje del selenio añadido ha sido biotransformado por las bacterias (Figura 18) (Palomo-Siguero *et al.*, 2017a). A continuación se describe con mayor detalle las etapas involucradas en la identificación y cuantificación de especies.

La extracción de las especies de selenio es una de las etapas más críticas en la especiación de este elemento, ya que se debe extraer cuantitativamente las especies, manteniendo la integridad de las mismas. Para la extracción de selenoaminoácidos, se

suelen emplear hidrólisis ácida (con ácido clorhídrico), básica (con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)) e hidrólisis enzimática. Esta última es la más común, puesto que al ser menos agresiva por realizarse en condiciones moderadas de temperatura y pH, existe un menor riesgo de que las especies puedan degradarse durante el tratamiento. En este caso, las enzimas más empleadas son las proteasas, como la proteinasa K (Montes-Bayonet *et al.* 2002), pepsina (Pedredr oet *al.* 2009), subtilisina (Cudermanet *al.* 2009) o la proteasa XIV (Vicente-Zurdo *et al.* 2019) aislada de *Streptomyces griseus*. Sin embargo, cuando la matriz es compleja pueden obtenerse rendimientos de extracción bajos, por lo que puede ser necesario el empleo de estas proteasas en combinación con otro tipo de enzimas, como lipasas para hidrolizar los ácidos grasos o amilasas empleadas para hidrolizar glucógeno y almidón (Kousaet *al.*, 2017).

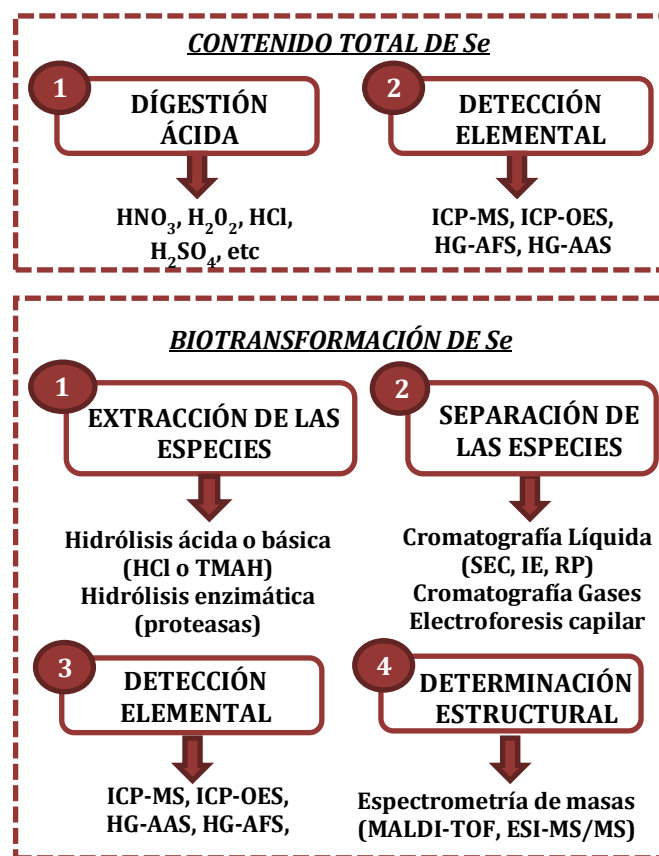


Figura 18. Etapas para la determinación de Se total y sus especies en bacterias ácido lácticas.

Una vez extraídas las especies de selenio, es necesario aplicar una etapa de separación antes de su detección y cuantificación. Las técnicas de separación más utilizadas para este fin son: electroforesis capilar (CE), cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Aunque mediante CE se pueden separar distintos analitos, su sensibilidad está limitada, prefiriéndose las técnicas cromatográficas para este fin (B'Hymer y Caruso, 2006). La GC es la más adecuada para analizar especies

volátiles de selenio, como $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ y CH_3SeH , o especies que aún no siendo volátiles se pueden derivatizar, pero con riesgo de que algunas de estas se puedan descomponer térmicamente (Moreno-Martín *et al.*, 2019). Por este motivo, la técnica más utilizada para la separación de especies de selenio es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Dentro de esta, los mecanismos cromatográficos más empleados son la exclusión molecular (SEC), el intercambio iónico (IE) y la fase inversa (RP) (Bierlaet *et al.*, 2008; Cubada *et al.*, 2010; Aureliet *et al.*, 2012). Por otro lado, hay casos en los que es necesario el empleo de dos mecanismos cromatográficos diferentes para lograr una identificación de especies inequívoca, ya que se puede producir la co-elución de varias de ellas (Spuznaret *et al.*, 2003). Por ejemplo, el tiempo de retención de la SeCys₂ cuando se utiliza una columna de IE es similar al tiempo de retención de la selenometionina oxidada, por lo que es una práctica común el empleo adicional de una columna RP para la confirmación del selenoaminoácido (Palomo-Siguero *et al.*, 2016). Para la etapa de detección y cuantificación de las especies de selenio separadas, lo más común es el acoplamiento de las técnicas cromatográficas comentadas con la técnica ICP-MS. De hecho, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es una de las estrategias más empleadas para la especiación de selenio (Rao *et al.*, 2017), especialmente en su aplicación a transformaciones de especies de selenio llevadas a cabo por bacterias lácticas (Alzate *et al.*, 2008; Palomo-Siguero *et al.*, 2016; Koushaet *et al.*, 2017; Palomo-Siguero *et al.*, 2017b;).

Por último, citar que la técnica HPLC acoplada a ESI-MS/MS se esta implementando en los estudios de especiación para la elucidación estructural de los compuestos de selenio (Pedrero & Madrid, 2009; Bianga *et al.*, 2013).

6.5. Técnicas de proteómica cuantitativa para la elucidación de los mecanismos implicados en la biotransformación de nanopartículas metálicas/metaloideas por poblaciones bacterianas.

Los estudios de proteómica cuantitativa son de especial relevancia para la elucidación de los mecanismos que regulan la biotransformación de las nanopartículas acumuladas en las células bacterianas.

Por lo general, un experimento proteómico suele desarrollarse en dos fases: la primera de ellas corresponde al marcaje cuantitativo de la muestra biológica; y la segunda a la cuantificación de proteínas, que implica el fraccionamiento de la muestra, el análisis por espectrometría de masas (MS) y el tratamiento informático de los datos obtenidos (Figura 19).

La espectrometría de masas no es una técnica intrínsecamente cuantitativa, y debido a las diferentes propiedades físico-químicas que presentan los péptidos proteolíticos, como por ejemplo el tamaño, se producen diferentes respuestas en el espectrómetro de masas. Por tanto, lo más común es llevar a cabo la cuantificación marcando las proteínas o péptidos mediante isótopos estables, de manera que una de las muestras se marca con un isótopo ligero (o natural), mientras que la otra se marca con el isótopo correspondiente pesado. Un péptido marcado con un isótopo es químicamente idéntico al péptido nativo (sin marcaje) y, por lo tanto, los dos péptidos se comportan de forma idéntica durante la separación cromatográfica. Sin embargo, al tener diferente masa producen señales distintas en el espectrómetro de masas, permitiendo llevar a cabo la cuantificación por comparación de las intensidades de las señales de ambos péptidos (Onget *al.*, 2002).

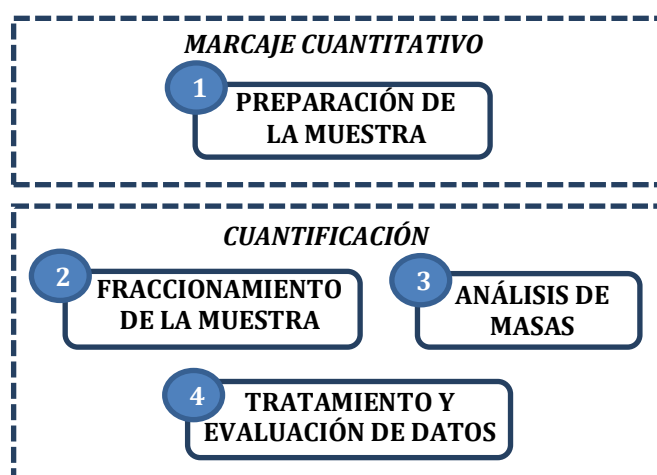


Figura 19. Etapas principales involucradas en un estudio proteómico.

De forma general, el marcaje de los péptidos o proteínas se puede llevar a cabo de forma metabólica o química. La principal diferencia entre estas dos estrategias está en la etapa en la que se produce el marcaje. En el marcaje metabólico, los isótopos estables se incorporan a los péptidos o proteínas durante el crecimiento y división celular, para lo que es imprescindible que el organismo crezca en medios que contienen ciertos componentes, por ejemplo aminoácidos, en su forma isotópica pesada. Por el contrario, en el marcaje químico, los isótopos estables pesados se incorporan a los péptidos o proteínas, una vez que ya han sido sintetizados, generalmente, mediante una serie de modificaciones químicas que se realizan frecuentemente en los extremos N-terminal y C-terminal de las proteínas o péptidos (Figura 20) (Bantscheff *et al.*, 2012).

En el caso concreto de cultivos bacterianos, se han aplicado ambas estrategias (Chenet *et al.*, 2017). El marcaje químico es mas complejo y origina una acumulación de

errores, ya que requiere llevar a cabo modificaciones en los péptidos y proteínas post-biosintéticas, unido a la necesidad de aplicar varias etapas de purificación. A diferencia de este, en el caso del marcaje metabólico, los marcadores isotópicos se introducen en el primer paso del experimento, es decir, durante el crecimiento y duplicación de las células. Además, las muestras a comparar se mezclan al principio del proceso analítico, mientras que, en el caso del marcaje químico, dichas poblaciones se tratan como muestras individuales hasta el análisis de las mismas. Esto hace que, en el caso del marcaje metabólico, se minimicen los errores debidos a la variabilidad en los tratamientos de muestra (Figura 20) (Bantscheff *et al.*, 2012).

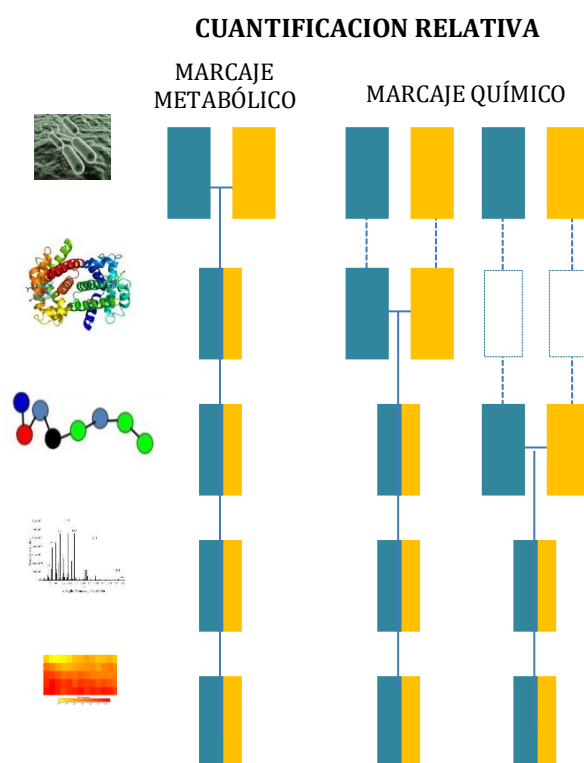


Figura 20. Esquema de trabajo seguido en las estrategias de marcaje metabólico y químico. Los cuadros naranjas y azules representan distintas condiciones experimentales. Las líneas discontinuas indican el tratamiento de muestra independiente y las líneas continuas la mezcla de las dos muestras. Adaptación de Bantscheff *et al* 2012.

El marcaje metabólico por excelencia es el que se conoce como estrategia SILAC (Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture). El procedimiento general de esta estrategia de marcaje se basa en la comparación a nivel de contenido proteico, de dos poblaciones celulares con diferentes estados, por ejemplo, un cultivo bacteriano tratado con un determinado agente tóxico y otra población bacteriana que no ha sido expuesta a dicho agente, de manera que se van a poder identificar y cuantificar las proteínas diferencialmente expresadas entre dichos estados. Por tanto, las proteínas cuya

abundancia sea diferente en ambos estados (proteínas alteradas) estarán probablemente implicadas en el proceso que se esté estudiando. En la Figura 21, se muestra un esquema general de un experimento SILAC, donde el marcaje isotópico de los aminoácidos se realiza en el cultivo celular.

Habitualmente, el medio de cultivo empleado en este tipo de experimentos contiene los aminoácidos marcados $^{13}\text{C}_6$ -lisina (Lys) y $^{13}\text{C}_6$ -arginina (Arg), por lo que tanto estos como los aminoácidos sin marcar serán incorporados por las células para sintetizar sus proteínas. De esta manera, también se asegura que tras la digestión con tripsinas los péptidos resultantes tengan al menos un aminoácido marcado (excepto el péptido que contiene el C-terminal de la proteína), lo que genera una diferencia de masas constantes entre estos y su homólogo sin marcar. Además, la identificación de la proteína se lleva a cabo con los espectros de fragmentación de al menos uno de los péptidos que co-eluyen (marcado o sin marcar), mientras que la cuantificación se realiza mediante la comparación de las intensidad de la distribución isotópica de los péptidos obtenidos en el espectro de masas.

Una vez que se ha realizado el marcaje cuantitativo se tiene que llevar a cabo la cuantificación de las proteínas, lo que implica etapas de fraccionamiento, análisis por espectrometría de masas y tratamiento e interpretación de los datos obtenidos (Figura 21).

Antes de realizar el análisis de las proteínas por espectrometría de masas, es necesario hacer una digestión enzimática de estas, con una enzima proteolítica como es la tripsina, para obtener los péptidos que las componen. La tripsina es altamente específica puesto que corta la proteína solamente por los residuos de Lys y Arg. Por último, se lleva a cabo la extracción de los péptidos generados empleando disoluciones orgánicas, por ejemplo ácido fórmico y acetonitrilo

El fraccionamiento de las proteínas obtenidas tras la digestión con tripsina suele llevarse a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis) que permite la separación de macromoléculas cargadas gracias a su movilidad en el gel en presencia de un campo eléctrico externo. El SDS es un detergente aniónico que provoca la ruptura de las interacciones no covalentes de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas dando lugar a cadenas polipeptídicas rodeadas de moléculas de SDS cargadas negativamente. Al formarse el complejo SDS-proteína se observa un valor constante de la relación masa/carga, por lo que su separación en el gel de poliacrilamida se deberá

fundamentalmente al tamaño, ya que la velocidad de migración de las proteínas desde el cátodo al ánodo se produce en función de su peso molecular. Para poder visualizar las proteínas separadas tras la electroforesis, se lleva a cabo una tinción de las mismas, para lo que se utiliza generalmente el azul de Coomassie y el nitrato de plata.

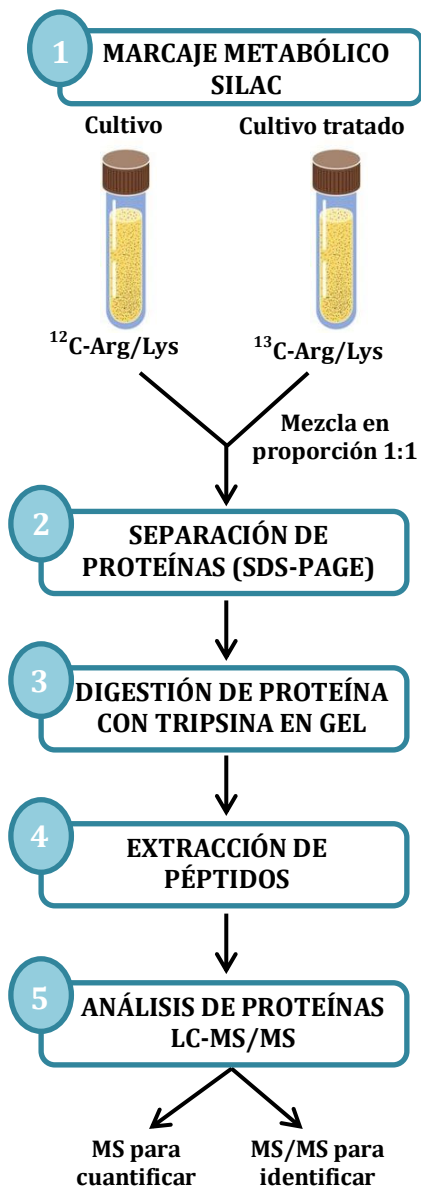


Figura 21. Esquema del procedimiento seguido en un experimento SILAC.

La combinación de la nanocromatografía líquida (nanoLC) y la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) suele ser la estrategia analítica empleada para el análisis de los péptidos obtenidos. La miniaturización de la fase cromatográfica trae consigo una serie de ventajas como son: 1) una mayor sensibilidad y eficacia en la separación de los picos, ya que se disminuye el diámetro interno de la columna y el tamaño de partícula del empaquetamiento cromatográfico; 2) la cantidad de muestra necesaria es menor, lo que resulta de gran utilidad cuando se quiere identificar proteínas poco abundantes; 3)

disminución del consumo de disolventes orgánicos, que son contaminantes peligrosos para el medio ambiente. Por otro lado, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite la fragmentación de los péptidos para obtener una información más detallada de la proteína objeto de estudio. Esta metodología implica la combinación de dos o más analizadores de masas de tal manera que uno de ellos va a actuar como seleccionador de iones de un valor m/z concreto, y en el otro va a tener lugar la fragmentación de los mismos y posterior análisis de los iones producto. En la Figura 22 se especifican las fuentes de ionización y los analizadores de masas más frecuentemente empleados para estudios proteómicos, y algunas de las combinaciones más empleadas en la espectrometría de masas en tándem (Sriramulu *et al.*, 2008; Mrvic *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2017).

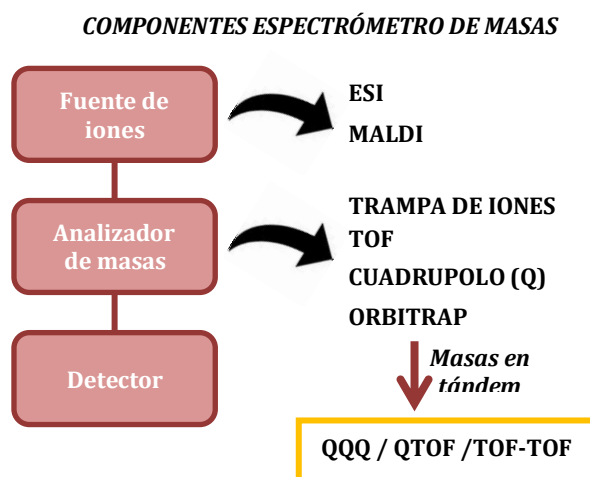


Figura 22. Componentes de un espectrómetro de masas empleado para análisis proteómico.

Para la identificación de las proteínas a partir de los espectros de fragmentación de péptidos obtenidos mediante MS/MS, es necesario el empleo de herramientas informáticas que comparen los valores de m/z de cada péptido del espectro de masas experimental con los valores teóricos derivados de bases de datos, como las de UniProt o la del NCBI (National Centre of Biotechnology Information). Si estos valores coinciden, la proteína es asignada al espectro de masas experimental con una cierta probabilidad que se conoce como “score”, el cual indica el grado de correlación entre los valores experimentales y teóricos. Por ejemplo, una de las herramientas informáticas más empleadas es el motor de búsqueda *Mascot*, el cual emplea como criterio principal de búsqueda la masa del ion precursor. Asimismo, para la cuantificación de los espectros también es frecuente el empleo de paquetes informáticos, como el software *Quixot*, que permiten integrar los picos procedentes de los espectros de masas para obtener las áreas de los picos correspondientes a los péptidos que provienen de cada una de las poblaciones.

Una vez obtenidas estas áreas, se puede establecer si una proteína está alterada, es decir, sobreexpresada o inhibida, mediante lo que se conoce como cociente SILAC. Este cociente se calcula a partir de las áreas de los péptidos marcados (péptido “pesado”) y sin marcar (péptido “ligero”) que se obtienen al integrar los picos obtenidos de los espectros de masas. La ecuación (Ecuación 8) que se utiliza para calcular el cociente SILAC se indica a continuación:

$$R_{SILAC} = \frac{\frac{S_{p1} + S_{p2} + \dots + S_{pn}}{S_{L1} + S_{L2} + \dots + S_{Ln}}}{n} \quad (8)$$

donde S_p es el área del pico correspondiente al péptido “pesado” procedente de la población celular B, S_L es el área del pico correspondiente al péptido “ligero” procedente de la población celular A, y n el número de péptidos cuantificados para una proteína determinada. De esta manera, proteínas con un cociente SILAC igual a 1 tienen la misma abundancia relativa en las dos poblaciones y, por tanto, su expresión no se ha visto modificada. Sin embargo, el umbral de significación tomado para establecer si una proteína está alterada se fija en cocientes SILAC por encima de +1.5 para proteínas consideradas sobreexpresadas, o en cocientes menores a -1.5 para proteínas que se consideran inhibidas.

6.6 Técnicas para el estudio del efecto de las nanopartículas en la biomasa total y en la estructura de biopelículas bacterianas.

La complejidad de las biopelículas microbianas desde el punto de vista estructural y dinámico, unido al elevado número de factores a tener en cuenta cuando las nanopartículas son el objeto de estudio, hace que sea imprescindible el empleo de plataformas multitécnica para poder elucidar el efecto de las nanopartículas en las biopelículas bacterianas y su mecanismo de interacción. En la Figura 23 se da una visión general de los métodos empleados para la visualización y estudio de la composición, fisiología y estructura de los *biofilms* bacterianos.

La primera etapa en los estudios relacionados con las biopelículas microbianas implica el crecimiento de los cultivos en dispositivos y superficies con diferentes características en función de la información que se quiera obtener. El desarrollo de biopelículas en placas de microtitulación es uno de los métodos más sencillos, y por ende, de los más utilizados. Sin embargo, como alternativa hay medios de soporte más sofisticados que permiten el desarrollo de biopelículas en condiciones controladas y con suministro continuo de nutrientes con el fin de mimetizar las condiciones naturales de la formación de biopelículas. Finalmente, también se han diseñado otro tipo de dispositivos

que permiten monitorizar en paralelo la formación de estas estructuras bacterianas y registrar los cambios temporales en el desarrollo de las mismas (Azeredo *et al.*, 2017).

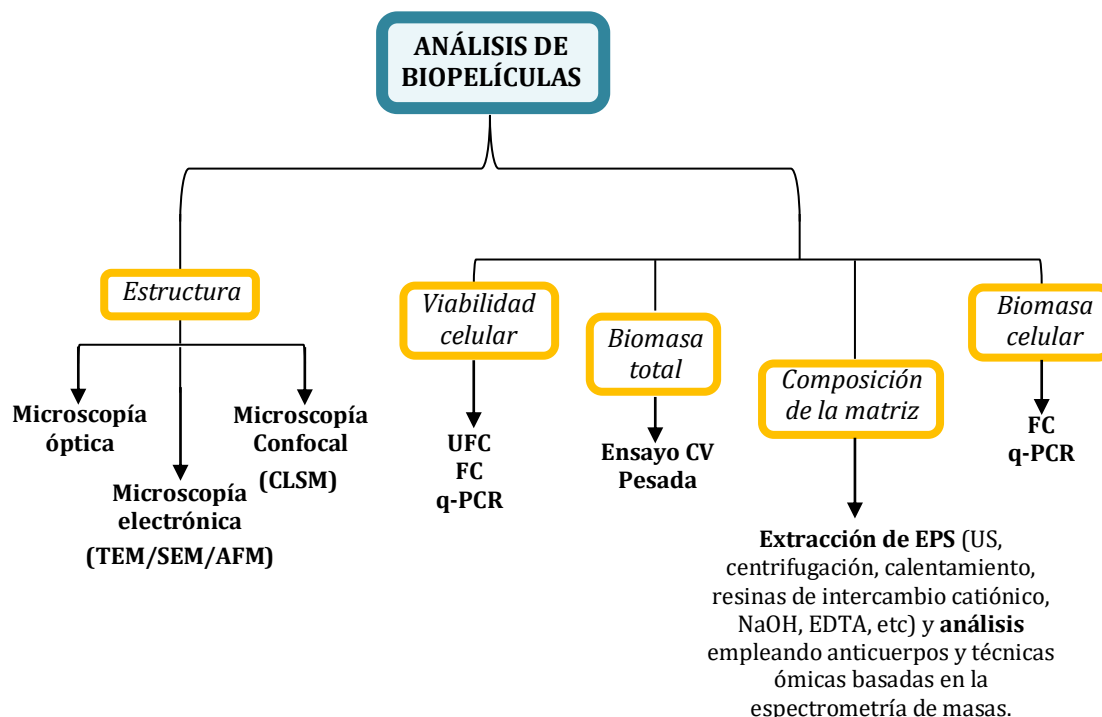


Figura 23. Métodos más frecuentes empleados en el análisis y caracterización de biopelículas microbianas. Adaptación de Azeredo *et al.* 2017.

Una vez formado el biofilm ya se pueden comenzar a estudiar los diferentes aspectos necesarios para conocer en profundidad las características de estos sistemas biológicos que han sido detallados en la Figura 23. A continuación, se van a describir brevemente dos de los métodos más empleados para estudiar las variaciones en la biomasa y la estructura de las biopelículas cuando son tratadas con las nanopartículas.

Ensayo de tinción con cristal violeta (CV)

El efecto de las nanopartículas en la biomasa total de la biopelícula proporciona información sobre la capacidad antimicrobiana de las mismas. Para la cuantificación de la biomasa total del *biofilm* tras la exposición a las nanopartículas, es muy frecuente el empleo de tintes o fluorocromos capaces de unirse o adsorberse a distintos compuestos de la misma. En este sentido, uno de los métodos más tradicionales es el ensayo colorimétrico que emplea la tinción con cristal violeta (Merrit *et al.*, 2011). Este compuesto químico tiñe tanto las células vivas como las muertas, así como algunos compuestos presentes en la matriz de la biopelícula. Entre las ventajas de este tipo de ensayos que emplean colorantes para la cuantificación indirecta de la biomasa de la biopelícula, cabe citar: 1) su versatilidad, puesto que pueden aplicarse a biopelículas formadas por diferentes especies

de microorganismos; 2) el hecho de que no requieren el desprendimiento de la biopelícula del soporte para llevar a cabo la cuantificación; y 3) la posibilidad de introducir muchas condiciones diferentes simultáneamente en un experimento, ya que se suelen llevar a cabo en placas multipocillo. Asimismo, las limitaciones de este tipo de ensayos son: 1) la posible pérdida de biomasa durante las etapas de lavado especialmente cuando se estudian microorganismos que se adhieren débilmente a las superficies; 2) una sobreestimación de la biomasa total debido a la sedimentación de células planctónicas, y a otro tipo de materia orgánica que puede quedar embebida en la matriz de exopolisacáridos; 3) la falta de reproducibilidad y 4) la naturaleza inespecífica del colorante cristal violeta, la cual no permite diferenciar entre especies en las comunidades polimicrobianas ni tampoco entre células viables y no viables (Azeredo *et al.*, 2017). Por otro lado, este tipo de ensayos tampoco permite visualizar de forma directa las biopelículas desarrolladas en presencia de las nanopartículas, ni tampoco estudiar los cambios en su estructura como consecuencia de la exposición a estos compuestos.

Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)

La microscopía confocal laser de barrido (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) permite obtener imágenes de una muestra a mayor resolución, contraste y nitidez que las adquiridas con la microscopía óptica convencional. Esta técnica se basa en el empleo de un láser de una determinada longitud de onda, que al irradiar la muestra hace que las moléculas excitadas emitan fluorescencia (ya sea autofluorescencia o fluorescencia asociada a fluorocromos adicionados a la muestra) a una longitud de onda superior a la aplicada, lo que permite eliminar la luz reflejada o fluorescente de los planos fuera de foco. La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con gran intensidad, puesto que al pasar a través de un pequeño orificio se convierte en una luz puntual que define la profundidad del campo y se enfoca sobre la muestra a observar mediante una lente. Asimismo, la luz emitida por la muestra es enfocada por una segunda lente hacia otro pequeño orificio localizado enfrente del detector. De esta manera, se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de planos inferiores y superiores (Pawley *et al.*, 2006). Como consecuencia de ello, el láser es aplicado en forma de barrido para poder obtener imágenes de diferentes planos focales, lo que permite el análisis tridimensional de las estructuras analizadas. Por tanto, se puede decir que la técnica CLSM combina el microscopio de fluorescencia con la imagen electrónica y puntos de luz suministrados con el fin de obtener imágenes en tres dimensiones de las estructuras biológicas objeto de estudio (Marínez-Nistal *et al.*, 1995).

Gracias a esta función, la CLSM es una herramienta muy útil para estudiar la estructura de las biopelículas microbianas, y para observar los cambios en la arquitectura de las mismas tras la exposición a las nanopartículas. Además, el empleo de fluorocromos específicos permite establecer la distribución espacial de las células viables y no viables en el interior del *biofilm*. Para ello es frecuente el empleo de la pareja de fluorocromos SYTO9/Yoduro de propidio (IP), que se unen a los ácidos nucleicos del ADN bacteriano, y permiten diferenciar las células viables de las no viables en función de la integridad de la membrana plasmática celular. En este sentido, el SYTO9 (fluorescencia verde) es capaz de atravesar la membrana de todas las bacterias, mientras que el IP (fluorescencia roja) solo puede atravesar las membranas celulares dañadas. De esta manera, la aplicación conjunta de ambos fluorocromos genera una fluorescencia roja o amarilla en bacterias no viables, cuya membrana celular está dañada, ya que el IP elimina la fluorescencia de SYTO9 desplazándolo en su unión al ácido nucleico. Sin embargo, el IP no penetra en la célula viable, por tanto, esta se tiñe de verde gracias a la unión de SYTO9 al ADN bacteriano (Pantanella *et al.*, 2013).

Por otro lado, el tratamiento informático de las imágenes adquiridas mediante CLSM posibilita, no solo representar la estructura tridimensional de la biopelícula, sino también obtener parámetros estructurales cuantitativos de la misma, como el biovolumen (volumen total de las células en el campo de observación), el espesor, la rugosidad y el porcentaje de células viables y no viables. Esto es de vital importancia para poder obtener datos numéricos del efecto de las nanopartículas en la arquitectura de las biopelículas microbianas.

OBJETIVOS/OBJECTIVES

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es **evaluar las posibles aplicaciones de las nanopartículas metálicas (AgNPs, ZnONPs y TiO₂NPs) y de metaloides (SeNPs y TeNPs) en el ámbito alimentario, principalmente en lo que concierne a su efecto en poblaciones bacterianas de interés en este sector**. En esta línea, los estudios se han centrado en dos tipos de poblaciones: patógenos alimentarios capaces de formar biopelículas, y bacterias ácido lácticas ampliamente empleadas por sus efectos nutricionales beneficiosos. Dentro de este objetivo principal se encuentra además implícita **la evaluación de los posibles efectos adversos que el empleo de la nanotecnología puede ocasionar tanto para el consumidor como para el medio ambiente**. En esta evaluación de riesgos cabe destacar los estudios llevados a cabo de migración de las nanopartículas desde el envase al alimento, ya que el desarrollo de envases activos es una de las aplicaciones más importantes de la nanotecnología en el sector alimentario.

Para la consecución de dicho objetivo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas basadas en metales y metaloides. Algunas de las nanopartículas empleadas en esta Tesis Doctoral se adquirieron comercialmente (AgNPs y TiO₂NPs) y otras se sintetizaron en el laboratorio (ZnONPs, SeNPs y TeNPs). En todos los casos resulta imprescindible llevar a cabo su caracterización físico-química (tamaño, morfología, composición, y concentración) mediante el empleo de una gran variedad de técnicas analíticas diferentes, pero complementarias: microscopía electrónica (TEM y SEM), técnicas de dispersión de luz (DLS y NTA), difracción de rayos X, técnicas de separación (ultrafiltración, AF⁴ y diálisis) y la técnica ICP-MS en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS). Para ello es necesario el desarrollo de metodologías para la caracterización de nanopartículas en muestras tan complejas y diversas como cultivos bacterianos, extractos procedentes de procesos gastrointestinales *in vitro*, materiales plásticos y alimentos.

2. Evaluar la idoneidad de distintas especies de bacterias ácido lácticas para su empleo en la elaboración de alimentos funcionales enriquecidos con selenio en diferentes formas químicas (SeO₃²⁻ y SeNPs). Para la consecución de este objetivo se han considerado los siguientes aspectos:

2.1 Establecer el efecto de la presencia de SeO_3^{2-} y SeNPs sobre la viabilidad de las bacterias ácido lácticas propuestas, y su supervivencia bajo las condiciones fisiológicas que se producen en el tracto gastrointestinal.

2.2 Determinar la acumulación y biotransformación del selenio (SeO_3^{2-}) por parte de las bacterias ácido lácticas seleccionadas, mediante estudios de especiación empleando la técnica HPLC-ICP-MS.

2.3 Elucidar el efecto del selenio sobre los procesos metabólicos de bacterias ácido lácticas en función de la forma química de selenio añadida (SeO_3^{2-} y SeNPs). Para ello se aplicará una estrategia de proteómica cuantitativa basada en el marcaje isotópico estable de aminoácidos en cultivo celular (SILAC), y la espectrometría de masas (ESI-MS/MS). Esta metodología permitirá establecer la alteración en la expresión de proteínas de las cepas bacterianas seleccionadas por efecto del selenio añadido (SeO_3^{2-} y SeNPs) en los medios de cultivo.

3. Determinar la biodisponibilidad de cinc en fórmulas infantiles y los riesgos asociados a su uso como ZnONPs en envases alimentarios. Para la consecución de este objetivo se han desarrollado los siguientes aspectos:

3.1 Estudiar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del cinc en fórmulas lácteas infantiles mediante procesos de digestión gastrointestinal *in vitro*, y aplicación de la técnica SEC-ICP-MS con el fin de determinar el tipo de proteínas a las que el Zn está asociado en este tipo de alimentos infantiles.

3.2 Preparación y caracterización de materiales plásticos de uso alimentario conteniendo ZnONPs como agente activo antimicrobiano.

3.3 Evaluar el riesgo de exposición a ZnONPs por migración de las mismas del envase al alimento. Para ello se estudiarán las transformaciones en las características físico-químicas de estas nanopartículas como consecuencia de su contacto con la matriz alimentaria o bien por su paso a través del tracto gastrointestinal. Para esto último se aplicará un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

4. Establecer el efecto de nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos y metaloideá en poblaciones bacterianas formadoras de biopelículas y que suponen un problema de seguridad alimentaria. La complejidad de los comportamientos colectivos de las comunidades microbianas que regulan la formación de biopelículas hará necesario el estudio de aspectos tales como:

4.1 Los mecanismos que gobiernan la interacción de las nanopartículas con los sistemas de comunicación bacteriana *quorum sensing*. Para llevar a cabo este estudio se empleará la bacteria modelo *Chromobacterium violaceum*, cuya capacidad para producir el pigmento de color morado, denominado violaceína, está regulado por procesos de QS.

4.2 El efecto de nanopartículas de metaloides (TeNPs, SeNPs) en la biomasa total y estructura de las biopelículas de patógenos comunes presentes en la industria alimentaria. Para abordar este punto, se recurrirá al empleo de la técnica de microscopía confocal que, combinada con herramientas bioinformáticas de tratamiento de imagen, posibilitará la reconstrucción tridimensional de la estructura de las biopelículas, y la obtención de parámetros estructurales cuantitativos como el biovolumen, el porcentaje de superficie cubierta por la biopelícula y la distribución espacial de las células viables, entre otros.

5. Evaluar la técnica ICP-MS en modo de detección de células individuales (SC-ICP-MS) para determinar los modelos de acumulación de nanopartículas en células individuales de poblaciones bacterianas planctónicas. La mayoría de los métodos empleados para llevar a cabo estudios de acumulación no tienen en cuenta la heterogeneidad de las poblaciones celulares. En consecuencia, los contenidos medios de acumulación de nanopartículas se estiman suponiendo que todas las células asimilan y procesan por igual las nanopartículas añadidas a los medios de cultivo. La combinación de la técnica SC-ICP-MS con la difracción de RX y la microscopía electrónica de transmisión, puede constituir una plataforma de técnicas analíticas muy poderosa para evaluar la acumulación, localización y transformación de las nanopartículas en células individuales. Su aplicación no es una tarea fácil y requiere de metodologías que aseguren que las células objeto de estudio lleguen intactas al sistema de medida.

OBJECTIVES

The main goal of the current Thesis focuses on the evaluation of the potential applications of metal (AgNPs, ZnONPs y TiO₂NPs) and metalloid (SeNPs y TeNPs) based-nanoparticles in the food sector regarding to their effect on different bacterial populations. Two types of bacteria have been evaluated: foodborne pathogenic bacteria biofilm producers and lactic acid bacteria with several health and nutritional benefits. Moreover, the risks associated with the use of nanotechnology for consumers and the environment have been specifically considered in this general objective. In this sense, it is worth mentioning the studies performed on the migration of nanoparticles from the packaging to the food, since the development of novel food packaging materials is nowadays the most common application of nanotechnology in the food sector.

In order to achieve this main goal, the following specific objectives have been established:

1. Synthesis and characterization of metal and metalloid based nanoparticles. Some of the nanoparticles used in the current Thesis have been commercially acquired (AgNPs and TiO₂NPs), whereas others were synthesized in the laboratory (ZnONPs, SeNPs and TeNPs). However, in all cases, it is necessary to perform their physical-chemical characterization (size, morphology, composition and concentration) by employing a wide variety of different but complementary techniques such as electron microscopy (TEM and SEM), light scattering techniques (DLS and NTA), X-ray diffraction, separation techniques (ultrafiltration, AF⁴ and dialysis) and ICP-MS in single particle detection mode (SP-ICP-MS). This extend requires the development of analytical methodologies for nanoparticle characterization in complex matrices of different nature such as, bacterial cultures, *in vitro* gastrointestinal digestion extracts, plastic materials and food samples.

2. Assessing the feasibility of different lactic acid bacteria species to develop selenium enriched- functional food by using different chemical forms of selenium (SeO₃²⁻ y SeNPs). The following aspects will be considered to achieve this specific objective:

2.1 Establishing the effect of SeO₃²⁻ y SeNPs on lactic acid bacteria viability, and the ability of the resulting Se-enriched strains to survive under the physiological conditions that occur in the gastrointestinal tract.

2.2 Determining the accumulation and biotransformation of selenium species by the proposed lactic acid bacteria strains using HPLC-ICP-MS.

2.3 Evaluating the effect of selenium chemical species (SeO_3^{2-} y SeNPs) on lactic acid bacteria metabolism. For this purpose, a quantitative proteomic approach based on stable isotopic labelling by amino acids in cell culture (SILAC) together with mass spectrometry (ESI-MS/MS), will be applied in order to establish the effect of selenium chemical forms on *Lactobacillus* protein expression.

3. Determining zinc bioavailability in infant formulas and the risks associated with its use as ZnONPs in food packaging. To achieve this goal the following aspects will be taken into account:

3.1 Zinc bioaccessibility and bioavailability determination in infant formulas by means of applying an *in vitro* gastrointestinal digestion model and SEC-ICP-MS measurements.

3.2 Development and characterization of plastic food films loaded with ZnONPs as antimicrobial agent.

3.3 Risk assessment of ZnONPs exposure due to their migration from packaging to food. This will be achieved by examining the role of food matrix on the physicochemical properties and gastrointestinal stability of ZnONPs. For the latter, an *in vitro* gastrointestinal digestion process will be applied.

4. Evaluating the effect of metal and metalloid based-nanoparticles (TeNPs and SeNPs) on biofilm producer bacterial communities which represent serious food safety problems. The complexity of collective behaviours such as biofilm formation in microbial communities needs to take into consideration the following aspects:

4.1 The mechanisms involved in the interaction of nanoparticles with the bacterial communication systems known as *quorum sensing* (QS). Different strains of *Chromobacterium violaceum*, whose capacity to produce the purple pigment (violacein) is regulated by a QS process, will be employed as model organism.

4.2 The effect of metalloid based- nanoparticle on the structure and total biomass of biofilm developed by pathogens commonly found in food industry. This aspect will be studied by employing confocal laser scanning microscopy together with digital image processing. This approach will allow us to obtain the 3D projection of biofilm and quantify biofilm structural parameters such as, biovolume, percentage of surface covered and spatial distribution of viable cells, among others.

5. Evaluating single cell ICP-MS (SC-ICP-MS) analysis to determine nanoparticles accumulation patterns at single cell level in planktonic bacterial populations. Most of the reported methods in the literature do not provide information on cell to cell variability. Therefore, the average contents of nanoparticle uptake in the entire cell population are usually estimated considering that all cells assimilate and accumulate equally the nanoparticles added to the culture media. The combination of SC-ICP-MS analyses along with X-ray diffraction and transmission electron microscopy technique may constitute a powerful analytical platform to evaluate the accumulation, fate and transformation of nanoparticles in individual bacterial cells. This is not an easy task since bacterial cells need to be introduced into the plasma in an intact form in order to get valuable results.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Estudio de la interacción de distintas formas químicas de selenio (SeO_3^{2-} y SeNPs) con bacterias ácido lácticas (LAB) mediante HPLC-ICP-MS y estrategias de proteómica cuantitativa. Aplicación al desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en selenio.

La aplicación de la nanotecnología en distintos sectores tecnológicos e industriales ha crecido de forma exponencial en los últimos años. En el caso de la industria alimentaria, los nanomateriales se están estudiando, desarrollando e incluso aplicando en prácticamente todas las etapas de la cadena de producción del alimento, desde la preparación hasta el envasado del mismo.

Un número elevado de estos desarrollos y aplicaciones se han centrado en el empleo de nanopartículas metálicas o de metaloides como fuente para incrementar la biodisponibilidad de elementos traza esenciales (Zn, Se o Fe). La preparación de alimentos funcionales enriquecidos con estos materiales puede constituir una alternativa para incrementar los niveles de estos elementos en el organismo, y por tanto disminuir los problemas de salud ocasionados por una deficiencia de los mismos. Entre los diferentes tipos de alimentos funcionales, los alimentos probióticos (basados en bacterias ácido lácticas) enriquecidos en selenio son una vía muy fácil y eficaz de incorporar este elemento esencial al organismo a través de la dieta.

El selenio es un elemento esencial para los seres vivos debido a su presencia en las selenoproteínas como el aminoácido SeCys. A este elemento se le han atribuido, entre otras, propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias. Como consecuencia, una dieta con bajo contenido en este elemento puede ocasionar problemas cardiovasculares, diabetes y trastornos de tiroides, entre otros. Por este motivo, es importante mantener una ingesta adecuada de este elemento para un buen funcionamiento del organismo. En este sentido, algunas especies del género *Lactobacillus* son capaces de acumular selenio y de biotransformar sus especies inorgánicas en especies orgánicas, las cuales son menos tóxicas y nutricionalmente más activas, ya que algunas de ellas intervienen en la formación de las selenoproteínas. Esto hace que estas bacterias sean candidatas potenciales para el desarrollo de alimentos y probióticos enriquecidos en

selenio. Por tanto, el estudio de la acumulación y biotransformación de especies de selenio por parte de las bacterias es importante a la hora de desarrollar este tipo de alimentos enriquecidos, puesto que la biodisponibilidad del selenio depende de la forma química en la que se encuentra en el alimento desarrollado. **En el primer trabajo de este capítulo (Artículo 1) que lleva por título “Food prospect of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101” (J. Funct. Food, 2017, 35, 466-473)**, se evalúa la idoneidad de dos especies de bacterias ácido lácticas, *L. acidophilus* CRL 636 y *L. reuteri* CRL 1101, para su empleo en la elaboración de productos fermentados enriquecidos en selenio, o para ser administradas como probióticos enriquecidos en este elemento esencial.

En una primera fase, se estudió la habilidad de estas dos especies de LAB para crecer en presencia de selenio (SeO_3^{2-}) y, posteriormente, la capacidad de las mismas para acumular y biotransformar el selenio inorgánico en selenoaminoácidos. Mediante el empleo de la técnica HPLC-ICP-MS, se pudo constatar que ambas especies fueron capaces de acumular el SeO_3^{2-} añadido a los medios de cultivo, y biotransformarlo principalmente en selenometionina (SeMet) y selenocisteína (SeCys), siendo la cepa *L. reuteri* CRL 1101 la que presentó una mayor capacidad de acumulación y biotransformación. Además, se detectó la presencia de SeNPs en los cultivos bacterianos tratados con selenio. La síntesis biogénica de SeNPs por parte de las bacterias es el resultado de un mecanismo de detoxificación empleado por estos microorganismos como consecuencia de su exposición a elevados niveles de selenito.

Paralelamente, también se evaluó la capacidad de estas dos especies de LAB enriquecidas en selenio para sobrevivir bajo las condiciones que se producen en el tracto gastrointestinal. Los ensayos realizados mostraron que la cepa *L. reuteri* CRL 1101, enriquecida con selenio fue resistente, tanto a las condiciones de pH que se dan en el intestino como a la presencia de sales biliares. Por todo ello, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que ambas cepas podrían administrarse como probióticos o utilizarse para fabricar productos fermentados que contengan bacterias enriquecidas con este elemento esencial.

Una vez comprobado que las especies de LAB estudiadas fueron capaces de acumular y biotransformar selenio a especies de selenio bioactivas, se evaluaron los mecanismos que gobiernan estas transformaciones. Estos estudios constituyen un aspecto clave en el desarrollo de alimentos funcionales, ya que su efecto beneficioso va a depender de los mecanismos de absorción celular, transporte, almacenamiento o excreción

involucrados. Aunque en la literatura científica existen numerosas evidencias sobre especies de bacterias ácido lácticas capaces de acumular y biotransformar selenio, no se conoce con exactitud los mecanismos por los que las LAB llevan a cabo la asimilación de este elemento.

Además de las formas químicas de selenio tradicionalmente empleadas para el desarrollo de probióticos enriquecidos en este elemento esencial, se ha propuesto recientemente el empleo de selenio en forma de nanopartículas debido a su mayor biodisponibilidad y menor toxicidad si se compara con otras formas químicas del selenio. Sin embargo, antes de su implementación es necesario conocer las rutas metabólicas que rigen la transformación de las nanopartículas cuando interaccionan con las bacterias ácido lácticas. En este sentido, los estudios de proteómica cuantitativa basados en espectrometría de masas constituyen una herramienta de gran utilidad para elucidar el metabolismo de las diferentes formas químicas de selenio en LAB. Por tanto, en **el segundo trabajo presentado en este capítulo (Artículo 2) que lleva por título “Silac-based quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 response to the presence of selenite and selenium nanoparticles” (J. Proteomics, 2019, 195, 53-65)**, se ha aplicado la estrategia de marcaje metabólico SILAC en combinación con la espectrometría de masas para profundizar en los mecanismos implicados en la interacción del selenio con las bacterias lácticas. Este enfoque proteómico ha permitido establecer las proteínas diferencialmente expresadas tras la exposición de la especie *L. reuteri* CRL 1101 a diferentes formas químicas de selenio (SeO_3^{2-} y SeNPs). Los resultados obtenidos confirmaron la sobreexpresión de las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia y biotransformación de selenio tanto en los experimentos llevados a cabo con SeO_3^{2-} como los que se realizaron con SeNPs. Sin embargo, únicamente se observaron diferencias en la expresión de proteínas fágicas y chaperonas (relacionadas con factores de estrés en presencia de selenito. Esto parece indicar una mayor tolerancia de *L. reuteri* 1101CRL a la presencia de SeNPs que de selenito. Además, la sobreexpresión de la proteína tiorredoxina reductasa, la cual protege a las células durante los procesos de estrés oxidativo, demuestra el potencial de *L. reuteri* CRL 1101 enriquecida con selenio para ser utilizada como probiótico con capacidad antioxidante. Cabe destacar que este es el primer estudio en el que se ha aplicado con éxito la estrategia SILAC para analizar la expresión diferencial de proteínas en una cepa de LAB bajo diferentes condiciones de cultivo (en este caso concreto en presencia de SeNPs y selenito).

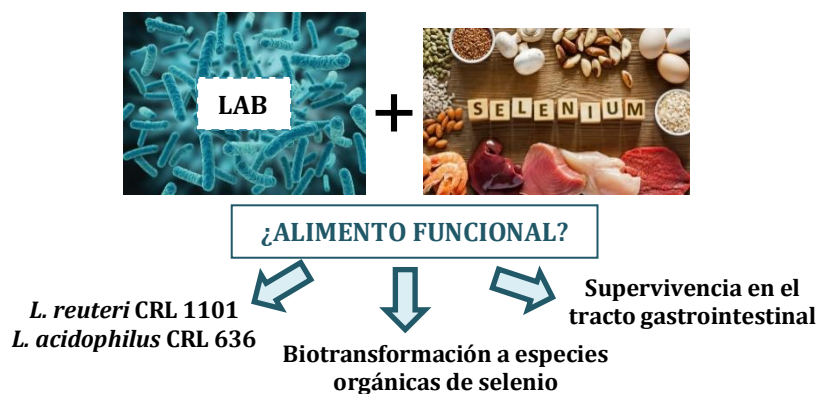
ARTÍCULO 1

Perspectivas alimentarias de *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 y *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 enriquecidos con selenio.

Food prospect of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101.

Pescuma, M., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Font, G., Madrid, Y., Mozzi, F.

J. Funct. Food, 2017, 35, 466-473.



Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“V INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA”. Benefitting from Lactic Acid Bacteria Progress in Health and Food. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina, Octubre de 2016. Tipo de comunicación: póster.

“12th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA”. Egmond and zee, Holanda, Agosto 2017. Tipo de comunicación: poster.



Food prospects of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101



Micaela Pescuma^{a,b}, Beatriz Gomez-Gomez^b, Teresa Perez-Corona^b, Graciela Font^a, Yolanda Madrid^{b,1}, Fernanda Mozzi^{a,*,1}

^a Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET, Chacabuco 145, 4000 Tucumán, Argentina

^b Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2017

Received in revised form 3 May 2017

Accepted 4 June 2017

Available online 13 June 2017

Keywords:

Lactobacillus

Lactic acid bacteria

Selenium

Selenocysteine

Nanoparticles

Selenium resistance

ABSTRACT

Selenium, which is present as SeCys in selenoproteins, is involved in cancer prevention, thyroid functioning, and pathogen inhibition. Lactobacilli can biotransform inorganic Se into seleno-amino acids. Growth, Se accumulation and seleno-amino acid formation by *Lactobacillus acidophilus* CRL636 and *L. reuteri* CRL1101 in a Se-supplemented medium were studied. Moreover, survival of Se-enriched strains to different pH values and bile salts was analyzed. *L. acidophilus* CRL636 showed low growth rate in the presence of Se while differences were less evident for *L. reuteri* CRL1101, which displayed higher amounts of intracellular SeCys and SeMet than the CRL636 strain. Interestingly, both lactobacilli could produce Se-nanoparticles. Se-enriched lactobacilli showed lower growth rates than non-Se exposed cells. The adverse effect of bile salts and the ability to survive at pH 4.0 diminished for the Se-enriched *L. reuteri* strain. The studied lactobacilli could be used as Se-enriched probiotics or as a vehicle for manufacturing Se-containing fermented foods.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element in living systems, found in nature as selenate and selenite. These soluble inorganic Se forms are potentially toxic. Certain microbes, fungi and plants can biotransform Se into elemental Se (Se₀) nanoparticles and into organic forms such as selenocysteine (SeCys), selenomethionine (SeMet) and selenomethylselenocysteine (SeMeCys) (Deng et al., 2015; Kieliszek, Błażej, Gientka, & Bzducha-Wróbel, 2015; Palomo-Siguero, Gutiérrez, Pérez-Conde, Cámara, & Madrid, 2016). Se deficiencies in human health have been associated to cancer, cardiovascular disease, diabetes, thyroid disorders and male infertility (López-Heras et al., 2014). Se human health beneficial effects are attributed to the presence of SeCys in 25 selenoproteins including thioredoxin reductase, glutathione peroxidase, iodothyronine deiodinases, selenoprotein P, selenoprotein W, and selenoprotein 15 (Palomo, Gutiérrez, Pérez-Conde, Cámara, & Madrid, 2014). SeCys is incorporated into the polypeptide chain in a UGA codon, which commonly signals a translation termination factor, when a *cis* and *trans*-acting element and protein factors decode this codon

as the 21st amino acid SeCys (Papp, Lu, Holmgren, & Khanna, 2007). Selenium is incorporated in humans through the diet especially as SeMet, SeCys, selenate or selenite. SeMet can be incorporated into proteins in place of methionine, or can be transformed into SeCys via a *trans*-sulfuration pathway. In turn, SeCys is converted into hydrogen selenide, a key metabolite to SeCys insertion in proteins (Nicastro & Dunn, 2013).

Lactic acid bacteria (LAB) are commonly used as starter cultures for the production of fermented foods; some species from this large group can bind, transport, and store metal ions inside the cell. The use of these bacteria to study their interaction with different ions for their application in functional food production, nutraceuticals and toxic ion removal from drinking water has been studied in the last few years (Mrvčić, Stanzer, Sôlić, & Vesna, 2012). Regarding Se binding and absorption by LAB, several studies on Se-enriched probiotics (Kheradmand et al., 2014; Pophaly, Singh, Kumar, Tomar, & Singh, 2014; Xia, Chen, & Liang, 2007; Yazdi, Mahdavi, Setayesh, Esfandiyar, & Shahverdi, 2013; Zhang et al., 2009), Se nanoparticle production (Nagy et al., 2016), Se bioremediation (Pieniz, Okeke, Andreazza, & Brandelli, 2011), and Se-enriched foods (Deng et al., 2015; Palomo et al., 2014) have been conducted. However, growth behavior of LAB in the presence of Se as well as the mechanisms involved in the biotransformation of inorganic Se into organic Se remains unclear. Indeed, publications on Se

* Corresponding author.

E-mail address: fmozzi@cerela.org.ar (F. Mozzi).

¹ Fernanda Mozzi and Yolanda Madrid are joint senior authors on this work.

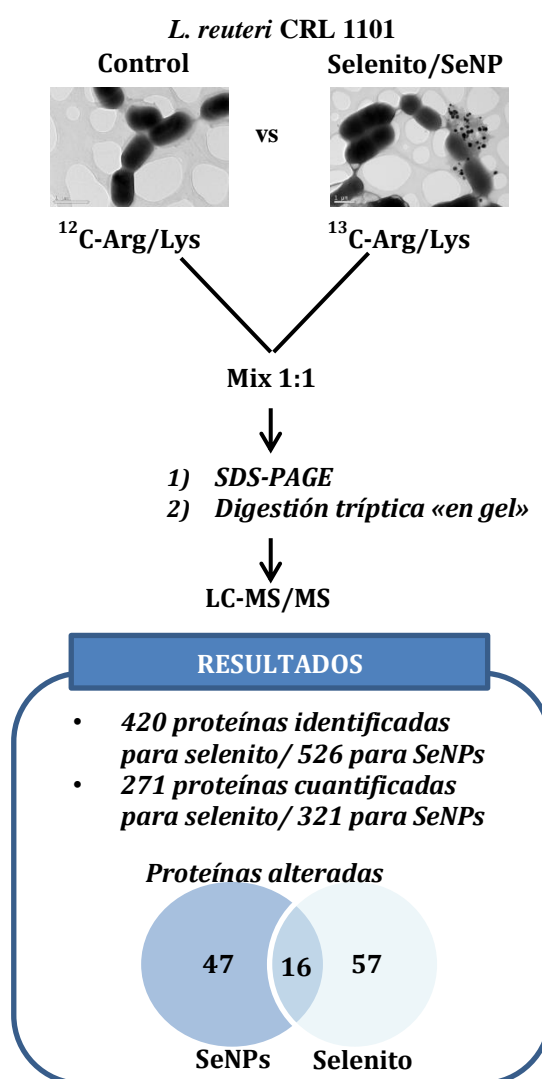
ARTÍCULO 2

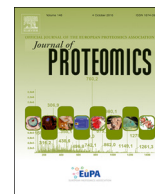
Análisis proteómico cuantitativo basado en la estrategia SILAC para el estudio de la respuesta de *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 a la presencia de selenito y nanopartículas de selenio.

Silac-based quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 response to the presence of selenite and selenium nanoparticles.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., Pescuma, M., Madrid Y.

J. Proteomics, 2019, 195, 53-65.





Silac-based quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 response to the presence of selenite and selenium nanoparticles

Beatriz Gómez-Gómez^a, Teresa Pérez-Corona^a, Fernanda Mozzi^b, Micaela Pescuma^b, Yolanda Madrid^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET, Chacabuco 145, 4000 Tucumán, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Selenium metabolism
Selenium nanoparticles
Lactic acid bacteria
SILAC
Nanoflow LC-MS/MS

ABSTRACT

Stable isotope labeling in cell culture (SILAC) was applied for the first time on a lactic acid bacterium strain (*L. reuteri* CRL1101) for analyzing differential protein expression associated to selenite(Na_2SeO_3) and selenium nanoparticles (SeNPs) exposure. 57 and 47 proteins were found de-regulated by > 1,5 fold in presence of selenite and SeNPs, respectively. Only 16 out of 104 proteins differentially expressed were commonly altered by selenite and SeNPs. The use of a clustered heat map allows us to visualize relations between the de-regulated proteins and exposure conditions. We identified a number of proteins involved in diverse functions and biological processes such as metabolism of carbohydrates, selenium and lipids; folding, sorting and degradation; environmental information and processing. In presence of both, selenite and SeNPs, proteins related to selenium metabolism such as cystathione beta-lyase and oxidoreductases (thioredoxine reductase and NAD/FAD oxidoreductase) were over expressed. Interestingly, the over expression of thioredoxine reductase could protect the host from oxidizing compounds. An over expression of phage proteins and chaperones with selenite was observed; this result and the fact that a lower cell count was detected when selenite was added could indicate that this latter Se species has a more deleterious effect than the nanoparticles.

1. Biological significance

Selenium toxicity and absorption in living systems is related to its chemical form. Some lactic acid bacterium are able to biotransform inorganic Se into seleno amino acids; however, the effect of this metalloid on lactobacilli behavior has not been extensively studied. In this work, a quantitative proteomics approach has been applied to get a deeper insight into the mechanism by which *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 resists and biotransforms selenite into seleno amino acids. For this purpose, stable isotope labeling in cell culture (SILAC) was successfully applied for the first time on a lactic acid bacterium strain in order to determine the differentially expressed proteins in the presence of different chemical forms of Se (selenite and selenium nanoparticles). The overexpression of proteins related to Se resistance and Se biotransformation was confirmed when selenite or SeNPs were added to the culture medium. However, differences on stress and phage proteins expression were observed indicating that SeNPs could have a less deleterious effect on *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. The over-expression of thioredoxine reductase in presence of selenium could protect the host from the presence of oxidizing compounds. To the best of our

knowledge, this is the first work in which SILAC was used for analyzing differential protein expression in a LAB strain under different culture conditions.

2. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are extensively used as starter cultures in the food industry due to their contribution on food safety, texture, flavor and nutrition. Moreover, some LAB strains have health-promoting properties. Based on these attractive features, several studies have focused on exploring their metabolic potential for the preparation of bioactive components during food manufacture or by using them as probiotics, which are known to modulate the gastrointestinal microbiota, prevent infections, stimulate the immune system and provide antioxidant properties [1].

Selenium (Se) is an essential trace element which has received an increasing attention because of its beneficial effects on improving immunity and thyroid function, preventing cancer and aging and inhibiting gastrointestinal tract inflammation. However, Se beneficial effects and efficacy have been found to be dependent on its

* Corresponding author at: Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.025>

Received 10 October 2018; Received in revised form 29 November 2018; Accepted 25 December 2018

Available online 27 December 2018

1874-3919/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Silac-based quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 response to the presence of selenite and selenium nanoparticles.

Beatriz Gomez-Gomez^a, Teresa Pérez-Corona^a, Fernanda Mozzi^b, Micaela Pescuma^b, ,
Yolanda Madrid^{a,*}

^a Complutense University of Madrid. Dept of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry.
Avda. Complutense s/n 2800, Madrid, Spain.

^b Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET, Chacabuco 145, 4000
Tucumán, Argentina.

TABLE OF CONTENTS

Table S1: Data from protein identified when bacteria were treated with selenite.

Table S2: Data from protein identified when bacteria were treated with SeNPs

SUPPLEMENTARY MATERIAL: TABLA S1. Data from protein identified when bacteria were treated with selenite

WP number	Protein name	score forward SILAC	score reverse SILAC	MW	% coverage forward SILAC	% coverage reverse SILAC	pI	Unique peptide detected forward SILAC	Unique peptide detected reverse SILAC
3663836	ribulose-phosphate 3-epimerase	1914	1845	23407	35.5	37.3	4.91	87	85
3663856	guanylate kinase	121	135	23531	15.5	14.8	5.51	5	5
3664204	deoxyadenosine kinase	96	75	24758	30.0	28.0	5.23	10	9
3664505	CamS family sex pheromone protein	58	32	40751	16.2	5.7	9.68	2	2
3664517	50S ribosomal protein L13	1104	1203	16294	45.6	49.6	9.64	59	62
3664530	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	485	485	34880	71.7	62.4	4.75	45	37
3664546	30S ribosomal protein S8	794	870	14527	56.0	58.3	9.48	27	30
3664556	30S ribosomal protein S3	9648	8805	24681	76.9	64.7	9.74	394	359
3664563	50S ribosomal protein L2	195	115	30451	37.7	35.1	10.64	7	6
3664566	50S ribosomal protein L4	845	1068	22277	52.4	54.1	9.99	48	54
3664567	50S ribosomal protein L3	7216	6242	23742	78.1	69.8	9.74	282	247
3664573	elongation factor G	5999	5222	76723	76.1	74.5	4.77	236	220
3664757	elongation factor P	61	78	20505	20.0	19.7	5.10	2	2
3665035	phosphonate ABC transporter ATP-binding protein	70	55	28060	30.3	17.7	9.02	4	3
3665048	cobalt transporter	37	46	34918	7.5	8.4	5.42	2	2
3665392	purine nucleoside phosphorylase	935	825	25735	62.7	58.7	5.26	54	43
3665397	two-component system response regulator	117	78	25720	30.1	29.7	4.87	4	2
3665449	phosphoglyceromutase	5474	3539	26105	71.1	58.8	5.69	319	224
3665658	cell division protein FtsH	251	239	77191	21.4	27.1	5.87	14	9
3665660	heat-shock protein Hsp33	89	74	33078	25.2	25.7	5.03	3	3
3665815	L-lactate dehydrogenase	3340	2449	34034	84.6	74.9	5.13	97	75
3665875	pyruvate kinase	5056	4992	51793	69.3	60.7	5.06	299	311
3666049	30S ribosomal protein S1	2920	2357	45968	84.6	69.0	4.98	154	132
3666143	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	154	130	29442	52.8	37.7	4.84	11	9
3666262	GntR family transcriptional regulator	232	196	26574	39.5	33.2	9.01	10	9
3666281	ribose-5-phosphate isomerase A	345	336	25021	79.7	71.8	5.29	30	32
3666300	50S ribosomal protein L1	10702	8297	24669	83.0	79.9	6.62	272	183
3666351	UDP-glucose 4-epimerase	4358	3694	36575	78.5	72.8	5.12	173	132
3666386	protein translocase subunit SecA	168	135	90295	34.9	33.8	5.88	12	11
3666394	HPr kinase/phosphorylase	382	148	35466	64.7	50.6	6.41	22	15
3666398	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	3245	2933	34081	81.3	72.0	5.88	131	105
3666452	phosphotransacetylase	3075	2742	34678	76.2	72.2	4.94	133	114
3666564	ATP synthase subunit b	64	72	19242	20.9	20.7	5.54	2	2
3666568	ATP synthase subunit alpha	1541	1810	55193	51.9	48.9	5.04	87	88
3666570	ATP synthase subunit gamma	852	735	34774	52.9	54.1	5.31	40	35
3666573	ATP synthase subunit beta	4026	3445	51600	88.0	71.2	4.82	164	131
3666578	rod shape-determining protein MreB	1000	874	35458	61.5	57.6	5.34	39	31
3666632	30S ribosomal protein S4	323	395	22929	40.3	47.3	10.06	31	36
3666650	rod shape-determining protein Mbl	1435	1240	34944	48.6	45.4	5.01	48	36
3666768	cell division protein FtsZ	732	661	44423	57.6	53.5	4.91	41	36
3666836	elongation factor Tu	20609	17680	43405	78.0	75.8	4.93	738	685
3666837	trigger factor	568	498	48717	58.7	58.9	4.45	33	31
3666838	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	263	171	45941	40.9	35.4	4.90	26	21
3666860	30S ribosomal protein S2	2452	2553	29639	87.0	82.1	5.13	180	157
3666861	elongation factor Ts	1034	812	31942	76.6	58.1	4.92	63	55
3666862	uridylyltransferase	535	470	25860	53.3	42.5	5.70	33	28
3666880	peptidase U34	89	54	51560	15.3	8.7	5.78	2	2
3666883	NAD kinase	43	58	30647	25.2	25.1	6.45	4	4
3666925	terminase	83	72	72414	30.7	30.9	5.36	8	8
3666926	portal protein	38	32	43283	11.4	11.4	4.83	2	2
3666934	tail protein	920	815	25284	41.1	39.8	4.81	29	21
3666943	lipase	47	57	42598	21.5	21.7	5.64	5	5
3666944	hypothetical protein	280	175	40647	45.0	25.1	5.51	11	9
3666953	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	280	192	44659	21.1	18.5	6.38	5	4
3666961	hypothetical protein	257	187	18620	44.4	29.5	4.84	9	7
3666968	antirepressor	1214	936	30185	58.4	54.6	9.59	12	8

3666994	farnesyl pyrophosphate synthetase	34	46	36788	21.2	21.9	6.64	2	2
3667018	thioredoxin reductase	34	54	60019	13.7	20.8	5.13	4	4
3667070	tyrosine protein phosphatase	37	37	29286	18.2	22.1	5.88	5	2
3667077	metallophosphatase	85	43	80840	8.9	11.0	4.80	6	4
3667083	phosphoglycerate kinase	1641	1408	30328	80.6	72.3	9.55	122	104
3667121	short-chain dehydrogenase	233	204	26373	52.4	31.7	5.25	15	10
3667130	triosephosphate isomerase	140	95	28359	35.2	39.1	5.29	10	7
3667132	aldo/keto reductase	145	194	35018	17.7	18.7	5.50	5	5
3667138	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	2601	1580	49913	58.1	55.9	5.87	96	60
3667152	glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	320	170	32932	52.5	41.5	9.71	16	13
3667176	tryptophanyl-tRNA synthase	260	141	38039	53.8	12.4	6.21	11	9
3667180	IpaB/EvcA family protein	201	139	36885	47.3	25.1	5.74	15	9
3667181	NAD-dependent deacetylase	99	75	26437	12.5	13.5	5.43	2	2
3667184	methionyl-tRNA synthetase	1131	918	76590	43.9	32.6	5.41	47	38
3667187	ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	42	59	33019	30.6	30.4	8.70	5	6
3667189	metal ABC transporter substrate-binding protein	1628	1510	34058	76.2	64.7	6.72	60	55,651106
3667190	ABC transporter ATPase	128	101	24970	40.8	30.9	5.97	11	9
3667193	purine operon repressor	390	205	30907	60.5	39.1	8.80	22	9
3667195	bifunctional protein GlmU	703	632	49979	35.2	25.9	5.91	21	19
3667197	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1039	764	36138	47.4	50.8	8.70	62	46
3667199	hypothetical protein	285	224	25903	41.2	18.8	8.98	10	7
3667200	sugar phosphate phosphatase	107	146	30446	40.7	27.8	4.61	6	4
3667210	CTP synthase	883	748	59563	51.5	41.0	5.22	48	40
3667214	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	24	30	45648	16.7	12.9	6.05	3	3
3667237	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	46	72	50496	18.7	17.4	4.95	2	2
3667239	DEAD/DEAH box helicase	292	170	56488	48.8	33.3	7.92	22	12
3667246	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	54	107	55954	20.7	12.4	5.18	5	3
3667251	cytosine deaminase	86	175	46383	21.8	19.9	5.51	6	10
3667268	lysyl-tRNA synthetase	575	418	58260	40.9	32.1	5.36	33	44
3667304	aspartate racemase	532	478	26747	61.0	61.7	5.03	48	43
3667307	nicotinate phosphoribosyltransferase	73	61	55575	19.9	13.3	5.41	4	3
3667309	nH(3)-dependent NAD+ synthetase	449	367	30521	69.8	30.9	5.06	15	10
3667314	beta-galactosidase	461	364	73513	38.2	25.6	4.77	21	19
3667315	beta-galactosidase	240	204	35662	35.4	25.1	4.90	10	7
3667318	phosphoglycerate mutase	88	39	28925	32.5	42.6	8.57	7	3
3667320	esterase	119	348	32681	37.5	37.5	5.55	13	20
3667321	cystathionine beta-lyase	661	554	41473	25.5	40.8	5.06	19	41
3667324	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	698	495	27521	54.2	59.8	6.23	25	19
3667327	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	1997	1289	28499	68.1	63.9	9.78	109	85
3667329	aminopeptidase C	235	264	51952	35.0	40.4	6.08	20	18
3667343	rRNA methyltransferase	131	80	27263	46.6	35.7	7.17	7	3
3667350	aminotransferase	36	42	43727	14.6	27.5	4.88	2	3
3667367	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	4462	3717	97127	52.4	45.7	6.21	272	184
3667369	ribonucleoside-diphosphate reductase	621	398	39224	39.8	46.0	4.58	24	22
3667371	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	1345	966	82686	58.8	48.1	5.19	101	72
3667393	exopolyphosphatase	86	54	57438	12.3	9.7	6.36	2	3
3667402	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein TsA	42	49	26789	37.8	37.1	6.31	3	3
3667405	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	123	146	37430	40.8	40.3	5.19	6	6
3667422	transcriptional regulator	237	175	23925	33.6	32.2	9.12	12	9
3667426	molecular chaperone GroEL	5714	8089	57088	87.6	81.4	4.71	273	296
3667443	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	412	322	36882	36.1	31.6	7.03	16	12

3667450	thioredoxin reductase	75	71	33285	20.6	28.1	4.68	2	4
3667456	phosphoglucosmutase	603	470	63667	36.9	32.2	5.04	22	19
3667464	protein of hypothetical function UPF0052 and CofD	49	33	36176	24.4	9.1	5.70	2	2
3667482	exoribonuclease R	181	146	91810	20.2	16.5	6.05	17	15
3667490	UDP-N- acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	249	247	32369	49.7	44.3	4.77	17	14
3667497	phosphoglucosamine mutase	516	662	48872	34.4	31.9	4.80	17	16
3667498	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	296	222	66570	40.4	37.2	4.97	21	16
3667503	hypothetical protein	580	475	30187	44.4	22.8	5.33	30	24
3667509	glucose-6-phosphate isomerase	346	388	50319	50.0	47.6	4.97	30	31
3667515	ornithine carbamoyltransferase	1408	1052	37536	69.9	51.9	5.33	89	70
3667516	carbamate kinase	1159	953	32988	42.3	51.0	5.36	47	45
3667540	arginine deiminase	197	318	46214	41.5	36.1	5.39	13	15
3667546	glutamine amidotransferase	48	43	26118	12.3	24.3	5.73	2	2
3667549	peptide chain release factor 1	48	40	41262	11.9	29.6	4.81	1	6
3667551	translation factor Sua5	58	49	37238	22.2	24.6	7.19	3	3
3667552	serine hydroxymethyltransferase	332	240	44923	47.0	36.7	5.97	17	12
3667568	D-alanine--D-alanine ligase	1719	1269	42485	65.9	59.8	4.94	74	61
3667574	glyoxal reductase	31	49	32063	22.1	22.0	5.93	2	2
3667592	aminotransferase V	153	123	42072	33.5	33.8	6.04	10	9
3667603	NADH dehydrogenase	144	266	44004	35.1	37.9	5.74	11	10
3667606	rod shape-determining protein MreC	67	59	31124	10.9	11.8	9.96	2	2
3667620	protein RecA	313	345	39039	41.2	40.8	5.37	18	19
3667630	preprotein translocase subunit YajC	110	97	16374	14.9	17.5	4.87	3	3
3667637	alanyl-tRNA synthetase	273	120	98457	29.5	22.4	5.14	14	11
3667643	glutamate racemase	118	96	28902	36.0	36.0	5.98	20	18
3667645	non-canonical purine NTP pyrophosphatase	99	109	21273	55.4	55.7	6.65	12	13
3667653	catabolite control protein A	148	113	36700	34.8	27.4	4.95	13	8
3667655	transcriptional regulator	964	1187	27144	66.5	60.9	4.70	52	40
3667662	DNA methyltransferase	144	203	31135	11.2	11.2	6.31	3	3
3667663	acetate kinase	2294	2499	43568	71.4	54.5	5.39	133	105
3667665	haloacid dehalogenase	63	78	28487	16.8	16.4	6.78	2	2
3667691	hypothetical protein	41	42	72532	10.5	13.4	5.03	2	2
3667751	3-oxoacyl-ACP synthase III	144	57	34889	31.5	27.8	6.30	6	5
3667755	ACP S-malonyltransferase	105	222	35583	30.1	30.1	6.32	11	11
3667757	3-ketoacyl-ACP reductase	1105	861	26457	50.8	50.8	8.95	41	34
3667758	3-oxoacyl-ACP synthase	469	518	42678	37.6	49.8	5.82	23	26
3667763	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	82	91	50878	20.2	20.8	5.99	3	2
3667767	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	63	74	28431	15.5	26.0	9.03	7	6
3667768	enoyl-ACP reductase	663	543	27375	52.0	49.5	7.66	59	36
3667771	DSBA oxidoreductase	228	180	24551	44.2	18.1	5.33	11	5
3667772	alpha/beta hydrolase	71	57	34971	37.8	17.6	5.07	9	6
3667808	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	166	230	65568	31.0	15.4	4.87	12	7
3667851	hypothetical protein	212	174	32208	39.4	25.7	4.96	5	4
3667853	hypothetical protein	51	44	63659	7.0	17.9	9.10	2	2
3667865	RNA methyltransferase	164	106	44818	25.1	20.9	6.34	7	6
3667876	penicillin-binding protein 1A	37	46	82026	6.0	7.9	8.99	2	2
3667919	Fe-S cluster assembly protein SufB	57	45	52713	13.2	11.9	5.18	3	2
3667927	Fe-S cluster assembly protein SufD	71	153	48052	23.1	19.6	5.31	7	9
3667939	dihydroxynaphthoic acid synthetase	49	107	30000	27.5	27.1	5.49	2	4
3667951	3,4-dihydroxy-2-butanone 4- phosphate synthase	108	124	43900	19.1	18.9	5.42	6	6
3667954	bifunctional diaminohydroxyphosphoribosylamino pyrimidine deaminase/5-amino-6-(5- phosphoribosylamino)uracil reductase	122	80	39634	32.7	18.9	9.33	7	5
3667955	ribonucleoside hydrolase	133	110	34713	26.1	25.2	4.62	11	6
3667956	phospholipase	34	49	87367	15.6	15.1	5.51	2	2
3667973	cell wall anchor	39	52	70569	5.4	10.9	8.62	2	2
3668014	hypothetical protein	876	675	23774	47.9	42.2	5.33	50	46

3668021	phage capsid protein	465	318	39322	52.0	44.7	5.11	19	20
3668026	portal protein	66	58	63281	23.7	20.4	5.13	5	6
3668034	primosomal replication protein N	144	90	34361	34.0	22.1	8.70	9	7
3668036	DNA recombination protein RecT	192	148	34741	33.3	17.5	4.80	6	4
3668044	antirepressor	1335	1158	28717	67.3	66.5	9.76	22	19
3668052	hypothetical protein	247	217	31051	48.1	27.7	4.71	13	10
3668059	gluconokinase	23	56	55382	13.4	13.0	5.37	4	4
3668076	pyrophosphatase	703	471	34173	49.5	29.6	4.70	36	24
3668100	hypothetical protein	145	194	30723	27.9	25.0	5.93	6	9
3668102	thymidylate synthase	86	30	36959	24.4	16.6	6.06	3	2
3668107	cytidylate kinase	430	314	24999	64.9	47.4	8.72	19	16
3668112	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	188	192	26677	40.8	38.7	9.62	15	19
3668116	S1 RNA-binding protein	47	64	33366	26.3	32.8	6.12	3	5
3668123	amino acid aminotransferase	1257	1145	43080	70.1	70.6	5.07	58	53
3668124	RNA polymerase sigma factor RpoD	189	108	43359	28.9	25.5	5.51	11	11
3668126	glycine--tRNA ligase subunit beta	454	326	78488	35.6	39.5	4.87	20	15
3668127	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	64	66	37820	24.3	24.7	5.43	8	9
3668129	GTPase Era	344	235	33769	64.8	40.5	8.78	35	26
3668131	phosphate starvation protein PhoH	43	49	37444	18.8	18.6	6.63	2	2
3668134	argininosuccinate lyase	356	389	51887	51.6	52.1	5.47	23	23
3668136	choloylglycine hydrolase	2000	1868	36082	80.9	81.5	5.04	80	72
3668146	aspartate--tRNA ligase	737	614	68388	47.0	36.2	5.01	31	24
3668151	16S rRNA methyltransferase	31	46	26752	10.4	10.1	5.48	2	2
3668152	ribosomal protein L11 methyltransferase	45	52	34945	23.8	23.6	5.06	3	3
3668161	hypothetical protein	103	86	16639	8.7	8.7	4.22	4	3
3668163	hypothetical protein	36	36	28391	15.2	22.1	8.90	2	2
3668167	elongation factor 4	33	42	68021	20.0	20.3	5.15	3	3
3668169	molecular chaperone DnaK	476	344	67171	45.2	32.9	4.78	29	24
3668179	tRNA pseudouridine synthase B	50	45	33675	10.6	17.6	9.28	2	2
3668181	translation initiation factor IF-2	538	502	83486	32.0	26.9	7.79	21	18
3668184	transcription termination factor NusA	569	575	44498	39.2	38.2	4.61	20	24
3668190	proline--tRNA ligase	476	322	64217	49.6	46.6	4.84	29	24
3668204	RNase HI	37	59	24887	10.7	10.9	9.11	2	2
3668232	ribonuclease Z	70	37	34477	22.3	20.1	9.10	2	2
3668244	RNase J family beta-CASP ribonuclease	178	152	66679	17.7	16.8	6.79	7	5
3668260	GTP-binding protein	584	488	68785	50.3	43.2	5.15	45	35
3668261	fructose 1,6-bisphosphatase	58	46	28448	24.5	19.6	5.01	3	2
3668265	dihydrolipoamide dehydrogenase	2312	2040	50694	52.0	54.5	5.10	131	86
3668266	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	3494	3398	48342	75.2	62.8	4.72	154	123
3668267	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	10285	8529	35221	75.1	73.7	5.04	393	313
3668288	amino acid aminotransferase	36	38	42965	15.5	14.9	5.36	2	2
3668290	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	42	49	27915	13.4	13.2	4.93	2	2
3668292	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	71	95	33802	15.6	15.6	4.94	2	4
3668295	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase	69	76	24861	11.0	11.4	4.75	2	2
3668302	ribose-phosphate pyrophosphokinase	460	389	36038	59.3	56.8	5.77	22	16
3668306	phosphoglycerate mutase	143	110	24778	41.3	34.3	6.51	8	6
3668307	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	74	63	42742	30.8	31.2	5.58	18	15
3668309	cysteine desulfurase	408	314	42455	12.8	15.9	5.05	8	7
3668310	5~-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	476	119	24671	60.6	33.8	4.67	18	4
3668313	cell division protein DivIVA	246	198	27575	41.1	33.7	4.53	11	8
3668317	cell division protein FtsA	51	55	50454	23.9	21.9	5.55	4	3
3668321	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	132	199	40581	28.4	19.1	9.11	7	6

3668324	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	99	106	50301	21.9	21.7	5.49	7	6
3668337	hypothetical protein	301	183	37878	56.7	41.8	5.29	13	6
3668369	signal recognition particle protein	259	231	54079	31.4	30.3	9.42	15	14
3668372	signal recognition particle-docking protein FtsY	101	105	55571	22.0	21.9	4.33	8	7
3668388	protein phosphatase	28	46	26907	7.3	10.4	5.97	2	2
3668390	16S rRNA methyltransferase	39	34	50347	15.1	14.9	6.11	3	3
3668391	methionyl-tRNA formyltransferase	264	226	34707	47.0	36.3	5.70	11	9
3668404	farnesyl-diphosphate synthase	55	63	31620	20.7	20.4	5.17	2	2
3668408	bifunctional protein FOLD	215	169	30406	51.4	37.4	8.52	9	6
3668415	YggS family pyridoxal phosphate enzyme	158	135	26978	20.9	21.3	5.75	5	4
3668425	hypothetical protein	46	46	38874	13.5	13.1	4.34	5	5
3668432	aspartate aminotransferase	82	364	43340	42.2	23.2	5.46	9	11
3668434	glutamate--tRNA ligase	195	270	58313	29.9	36.5	5.35	16	14
3668435	glutamine synthetase	1455	1351	50803	50.1	46.8	5.36	48	44
3668439	glucokinase	2219	3036	34399	63.2	53.9	4.99	83	89
3668444	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	369	344	21102	35.9	35.3	4.96	20	19
3668445	penicillin-binding protein	32	35	76061	11.3	10.2	9.27	2	2
3668449	uridine kinase	217	189	25119	52.3	51.2	5.26	16	14
3668452	phenylalanine--tRNA ligase subunit beta	99	124	88948	19.4	16.0	4.92	10	9
3668455	phenylalanine--tRNA ligase subunit alpha	208	170	39002	33.9	29.9	5.63	13	8
3668462	23S rRNA methyltransferase	183	137	28292	25.2	25.2	5.23	11	10
3668474	two-component system response regulator	75	118	26314	34.6	28.1	4.99	11	8
3668483	GTPase	40	37	42262	18.9	4.0	6.47	2	2
3668487	primosomal protein DnaI	30	61	35825	10.2	8.3	7.75	2	2
3668496	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	56	63	48551	24.2	23.2	4.80	7	7
3668507	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	103	97	24659	34.7	34.9	5.64	9	9
3668513	peptidylprolyl isomerase	730	618	34642	52.2	52.9	9.60	25	23
3668521	arginine--tRNA ligase	3514	2980	63839	69.4	62.5	5.35	147	128
3668522	phosphomethylpyrimidine kinase	727	672	29299	64.2	63.2	4.95	45	34
3668523	L-lactate dehydrogenase	172	124	33333	31.4	28.2	5.79	5	3
3668535	ribokinase	1064	1268	32021	82.3	90.2	4.80	84	103
3668542	dipeptidase PepV	704	742	51188	63.0	63.6	4.70	36	36
3668543	carbohydrate kinase	260	182	30530	41.3	33.4	5.35	14	9
3668546	leucine--tRNA ligase	119	104	92860	17.2	19.0	5.21	8	7
3668547	S-adenosylmethionine synthase	72	240	43169	25.6	22.3	4.84	6	5
3668559	aldo/keto reductase	133	77	30832	50.0	16.7	5.46	8	1
3668564	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1764	1581	64709	64.5	60.8	4.91	85	71
3668582	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein	140	126	81816	26.2	25.5	5.38	10	9
3668598	cell wall-binding protein	67	63	21842	20.1	20.6	4.95	2	2
3668625	peptide chain release factor 3	43	46	59440	25.5	25.1	5.16	8	8
3668648	hypothetical protein	163	151	19681	13.8	18.0	8.65	4	3
3668649	hydrolase Nlp/P60	349	276	48985	21.0	19.1	4.95	14	9
3668650	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	942	813	58147	40.9	34.1	4.74	49	39
3668652	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase	796	725	55856	53.5	52.6	5.43	36	34
3668656	galactofuranosyltransferase	36	49	38164	30.8	30.6	6.62	4	4
3668681	aminotransferase	97	127	42306	18.5	20.9	4.92	2	5
3668684	methionine aminopeptidase	231	210	31646	24.2	31.9	5.24	10	9
3668691	helicase	55	60	48742	6.2	8.3	9.93	3	2
3668692	oxidoreductase	306	183	38248	17.4	16.8	4.99	3	5
3668710	nitroreductase	315	279	24737	49.3	44.0	5.28	19	17
3668753	lipid kinase	36	37	37147	16.9	17.2	5.59	6	6
3668754	aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	438	392	53391	50.8	47.6	5.34	20	17
3668756	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	641	517	52977	64.1	59.8	4.90	27	23
3668763	ATP-dependent DNA helicase PcrA	64	80	86238	18.3	21.8	5.63	10	8
3668776	energy-coupling factor transporter ATPase	37	43	30418	21.1	21.0	5.37	2	2

3668780	adenylate kinase	894	749	24593	57.5	55.7	5.39	44	33
3668784	50S ribosomal protein L5	3984	4307	20159	81.2	84.4	8.73	186	211
3668793	DNA-directed RNA polymerase subunit beta~	37	49	135339	18.9	18.2	7.05	7	7
3668795	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein	214	181	92871	33.7	35.4	6.31	25	21
3668796	alcohol dehydrogenase	7218	7233	36102	83.9	82.6	5.82	410	379
3668798	deoxyadenosine kinase	90	98	24632	53.5	53.2	5.03	5	5
3668809	Cro/C1 family transcriptional regulator	33	42	25227	18.8	18.4	5.07	3	3
3668818	arginine ABC transporter ATP-binding protein	59	56	27469	19.5	19.7	6.00	7	7
3668855	cytochrome C	829	736	50100	69.8	65.8	5.79	43	39
3668857	fumarate hydratase	920	876	50280	62.1	61.3	4.93	56	54
3668860	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	461	398	22185	41.1	37.6	5.15	17	15
3668868	aldose 1-epimerase	207	182	37903	31.0	22.3	4.83	10	8
3668890	esterase	129	79	26611	24.4	40.8	4.94	9	5
3668897	cysteine synthase	211	181	32582	47.0	37.0	5.09	7	5
3668907	hypothetical protein	367	312	67673	47.1	46.1	5.67	30	27
3668909	NADPH-flavin oxidoreductase	243	166	28845	37.5	34.0	5.98	17	12
3668981	rRNA methyltransferase	1655	1419	31785	82.8	75.5	5.82	90	73
3669019	phosphoglycerate mutase	77	68	24272	30.4	30.7	5.16	5	5
3669021	GTP-binding protein	41	48	47730	7.1	14.6	5.08	2	2
3669047	prolyl aminopeptidase	190	104	34819	23.4	19.1	4.97	3	5
3669057	integrase	33	49	26064	8.5	8.6	9.49	2	2
3669058	ferredoxin--NADP reductase	136	128	35769	9.0	9.3	5.09	3	3
3669060	inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	1326	1153	34884	54.7	49.7	4.75	78	64
3669062	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	1497	1377	26908	64.1	62.2	5.35	78	67
3669082	lipoate-protein ligase A	743	698	38450	59.6	54.9	5.21	40	36
3669092	phosphoketolase	19740	17576	91346	64.9	58.4	5.09	1344	1183
3669097	peptidase C69	190	154	54260	33.3	31.3	5.17	6	4
3669102	lactate dehydrogenase	2805	2887	37335	86.5	73.7	4.81	155	170
3669120	delta-aminolevulinic acid dehydratase	160	154	35817	42.1	39.6	5.57	21	21
3669146	cobalt-precorrin-4 C(11)-methyltransferase	78	91	27854	33.6	42.3	5.40	5	5
3669162	FMN reductase	53	79	31408	21.8	16.1	6.10	4	2
3669177	aldehyde dehydrogenase	855	768	51095	48.4	42.6	5.29	36	32
3669186	phosphate propanoyltransferase	176	184	23947	50.0	49.6	6.36	18	18
3669190	microcompartment protein	81	31	20477	30.7	22.8	4.99	4	2
3669197	propanediol dehydratase	522	457	25792	59.7	53.8	5.34	23	20
3669198	propanediol dehydratase large subunit	968	853	62052	56.1	51.8	4.74	70	61
3669200	propanediol utilization protein PduB	859	789	24929	51.7	48.3	5.20	35	33
3669212	tRNA synthetase subunit beta	152	445	27274	38.2	44.4	4.74	12	16
3669219	multidrug ABC transporter ATPase	333	232	31717	26.1	28.6	5.11	13	8
3669241	peptidase S24	88	58	54892	16.6	30.6	5.54	5	6
3669261	cysteine synthase	2009	1795	32221	87.3	89.3	5.66	108	88
3669271	peptidase M13	375	346	72345	37.2	34.1	5.23	21	18
3669317	histidine decarboxylase	1093	821	34056	40.8	39.5	4.80	53	46
3669323	fructose 2,6-bisphosphatase	50	54	24646	12.0	12.9	5.49	5	5
3669325	glycerol dehydrogenase	3349	3436	40673	66.0	56.8	4.93	183	158
3669340	histidyl-tRNA synthetase	27	58	48206	20.5	17.2	5.03	4	4
3669346	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase	2327	2099	60411	52.5	51.1	9.52	95	84
3669352	peptide ABC transporter ATP-binding protein	39	46	25049	26.2	24.3	9.35	2	2
3669358	alcohol dehydrogenase	34	39	35895	19.9	19.4	5.00	4	4
3669392	aminopeptidase	746	811	50819	53.9	46.4	5.55	36	38
3669394	NAD-dependent dehydratase	1297	935	23173	47.4	48.8	4.98	54	49
3669396	aminopeptidase N	109	117	95265	18.6	24.1	4.74	8	7
3669400	aspartate--ammonia ligase	68	55	39364	19.9	19.0	5.17	12	14
3669417	asparaginase	35	43	35682	24.0	23.8	5.01	2	2
3669419	aminotransferase	30	34	43712	10.3	14.6	5.10	2	2
3669467	amidohydrolase	93	66	57384	22.0	10.9	5.04	4	2
3669468	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	3702	2446	32351	64.8	67.2	5.02	195	123

3669485	chromosomal replication initiator protein DnaA	34	33	49912	11.4	11.9	5.50	2	2
3669487	DNA polymerase III subunit beta	32	42	41806	8.2	10.8	4.67	2	4
3669492	single-stranded DNA-binding protein	52	65	20536	23.0	29.4	4.69	5	7
3669517	serine protease	74	72	43839	13.9	14.5	9.29	2	2
3669531	pyrroline-5-carboxylate reductase	1416	890	29362	48.9	45.6	5.28	42	31
3669555	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein	13062	14966	82255	78.7	68.2	5.13	829	704
3669571	maltose phosphorylase	641	359	86691	46.4	34.3	4.93	38	30
3669573	beta-phosphoglucomutase	348	418	23965	47.3	56.4	4.59	14	15
3669587	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	519	536	32600	53.8	44.4	5.25	19	20
3669593	NADH oxidase	134	103	49574	12.7	12.6	5.33	3	2
3669595	GMP reductase	1238	1025	35937	63.9	62.8	6.46	106	89
3669597	adenylosuccinate synthetase	905	1346	47695	52.1	50.2	5.43	48	48
3669598	hypothetical protein	147	75	29474	12.3	13.8	5.38	4	2
3669636	FMN reductase	213	182	45646	19.7	17.8	4.67	14	9
3669649	serine--tRNA ligase	212	105	49260	42.5	32.0	5.60	25	33
3669654	peptide ABC transporter ATP-binding protein	78	66	27504	37.2	36.0	5.50	12	9
3669659	ribonucleoside hydrolase	1350	1269	32552	49.0	49.0	4.70	88	69
3669661	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	119	219	32911	35.4	33.0	4.97	3	7
3669663	ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	73	64	26523	29.0	29.3	6.92	3	3
3669667	chromosome partitioning protein ParB	141	117	33155	38.4	32.8	9.77	10	8
3669679	phosphopentomutase	306	296	43975	36.5	45.1	4.97	13	17
3669681	pyrimidine-nucleoside phosphorylase	45	65	46555	38.0	24.1	4.98	9	2
3669685	inosine-5-monophosphate dehydrogenase	294	188	39349	48.7	56.8	5.31	19	12
3669697	dihydroorotase	46	54	46421	8.4	8.1	5.41	2	2
3669699	dihydroorotate dehydrogenase	89	152	32716	23.1	41.6	9.11	6	7
3669700	orotidine 5~-phosphate decarboxylase	162	138	26951	39.9	37.4	5.91	12	9
3669702	orotate phosphoribosyltransferase	71	126	23419	40.4	38.5	7.90	6	8
3669710	formate--tetrahydrofolate ligase	9573	7076	60214	60.2	55.6	5.48	476	345
3669712	acetolactate synthase	717	644	60957	53.7	47.7	5.14	30	26
3669715	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	652	590	42402	50.0	44.8	5.82	24	25
3669716	adenylosuccinate lyase	971	1003	49423	52.7	47.3	5.86	86	75
3669718	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	9258	7606	27291	77.4	67.8	5.72	448	322
3669722	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurQ	2385	2043	24716	61.5	56.0	5.77	206	189
3669724	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL	2761	2165	80894	51.2	50.3	4.75	106	87
3669725	amidophosphoribosyltransferase	223	118	52951	20.0	15.9	6.50	7	5
3669727	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	1311	1642	36952	53.9	71.0	5.68	94	81
3669728	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	226	180	21150	23.2	40.5	5.85	11	9
3669729	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	6972	5653	56997	81.6	80.7	5.43	527	459
3669731	phosphoribosylamine--glycine ligase	443	390	45731	37.9	33.7	5.38	37	24
3673191	cysteine--tRNA ligase	32	48	53786	11.1	13.2	5.48	2	2
3673220	pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha	6868	5257	40977	76.1	74.0	5.35	323	286
3673346	oxidoreductase ion channel protein IolS	183	90	36274	24.8	20.8	5.04	5	4
3676152	uracil phosphoribosyltransferase	833	703	23302	61.6	66.8	5.65	41	35
4562477	asparagine synthase	296	242	74531	41.3	38.5	5.48	26	22
11953350	polyphosphate--AMP phosphotransferase	58	54	34354	23.6	23.4	9.66	4	4
11953351	two-component system response regulator	174	143	26849	39.6	48.9	5.25	4	3
11953356	1,3-propanediol dehydrogenase	4486	4135	42153	68.7	67.9	5.54	204	196
11953361	glutamine amidotransferase	392	249	26601	20.7	7.4	6.10	9	6

11953367	deoxyribose-phosphate aldolase	1700	907	24227	60.7	61.6	4.93	85	70
11953372	alpha-acetolactate decarboxylase	57	64	26336	7.1	8.4	4.78	3	3
11953377	NADH-flavin reductase	2561	1553	23712	50.9	54.6	6.45	95	79
11953379	L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase	1145	739	33951	69.0	65.2	5.31	36	22
11953388	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD, partial	33	37	49424	12.1	11.7	9.64	2	2
11953396	polyphosphate kinase	33	49	86332	6.8	7.5	6.08	2	2
11953404	ribokinase	98	85	32406	14.7	21.2	4.75	2	3
11953416	oxalyl-CoA decarboxylase	86	79	62255	18.2	18.8	5.36	5	5
11953417	septation ring formation regulator EzrA	42	49	66189	13.8	13.2	5.27	6	6
11953421	phosphoesterase	40	47	35378	13.5	8.5	4.95	2	2
11953422	DEAD/DEAH box helicase	165	123	52568	27.1	27.8	9.95	6	6
11953439	argininosuccinate synthase	592	744	45366	48.5	52.2	5.13	35	51
11953441	SAM-dependent methyltransferase	54	54	26315	24.3	34.9	5.33	6	5
11953442	peptidase T	102	121	46098	16.0	20.7	4.75	4	5
11953444	hypothetical protein	107	87	48727	28.3	27.1	4.41	6	4
11953455	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	224	103	44665	21.8	19.0	6.60	2	2
11953468	GNAT family acetyltransferase	721	644	19977	46.0	46.0	4.90	40	36
11953482	integrase	31	39	47189	9.8	10.4	9.46	2	2
11953496	phage capsid protein	2308	1997	43488	71.9	70.7	5.19	116	90
11953503	hypothetical protein	381	35	61378	34.6	17.0	4.53	19	2
11953505	exonuclease SbcC	47	68	35175	24.1	19.0	4.83	4	3
11953519	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	48	41	32785	19.5	19.3	5.73	2	2
11953527	UDP-galactopyranose mutase	249	199	43487	21.8	20.6	5.63	15	14
11953536	acetoin reductase	10274	9967	27054	88.3	83.5	4.94	311	287
11953539	RNase J family beta-CASP ribonuclease	30	39	69526	13.9	13.4	7.14	2	2
11953543	peroxidase	582	683	36068	47.8	47.5	5.00	24	22
11953557	GMP synthase	126	119	57660	19.7	27.1	5.13	4	8
11953560	ATP-dependent DNA helicase	41	46	89138	10.8	10.4	7.31	2	2
11953561	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding subunit	10943	9021	36543	95.2	80.3	4.80	343	295
11953571	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	24	32	46652	12.3	12.1	5.23	3	3
11953574	precorrin-8X methylmutase	170	165	25304	33.9	37.0	7.10	8	6
11953576	alcohol dehydrogenase	1540	1398	40335	51.5	46.7	5.76	40	37
11953580	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	2208	1719	56338	75.1	69.6	5.81	118	96
11953581	6-phosphogluconate dehydrogenase	11384	11414	53365	81.8	83.5	5.54	477	433
11953599	threonyl-tRNA synthetase	3251	2977	68722	61.4	60.4	5.20	144	125
11953601	NAD-dependent dehydratase	53	51	24091	12.4	12.6	4.71	2	2
11953603	asparagine--tRNA ligase	185	142	50061	37.3	40.7	5.03	17	18
12390487	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	55	91	44927	13.0	15.6	5.46	2	2
12390507	excinuclease ABC subunit B	89	70	76986	28.0	27.0	5.26	10	8
12390521	isoleucine--tRNA ligase	55	64	106631	15.9	15.3	4.91	6	6
12390531	UDP pyrophosphate synthase	65	62	29311	20.1	20.4	6.25	4	4
12390570	phosphomethylpyrimidine kinase	221	190	29118	19.1	19.5	5.71	5	5
35152443	DNA gyrase subunit B	662	529	71281	45.7	45.0	5.72	32	31
35164171	neopullulanase	142	121	67374	24.8	14.8	5.50	4	3
35164302	hypothetical protein	110	90	81761	33.0	31.9	5.69	16	14
48569017	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	1219	724	15993	51.4	51.4	4.53	41	44

SUPPLEMENTARY MATERIAL: TABLE S2. Data from protein identified when bacteria were treated with SeNPs

WP number	Protein name	score forward SILAC	score reverse SILAC	MW	% coverage forward SILAC	% coverage reverse SILAC	pI	Unique peptide detected forward SILAC	Unique peptide detected reverse SILAC
3663667	MarR family transcriptional regulator	150	134	17555	47.3	40.8	9.42	3	3
3663816	30S ribosomal protein S16	178	157	10443	50.5	49.6	10.21	5	5
3663823	acyl carrier protein	134	117	9489	45.2	53.6	3.98	8	6
3663836	ribulose-phosphate 3-epimerase	1703	4894	23407	51.2	51.2	4.91	110	144
3663856	guanylate kinase	79	75	23531	33.0	18.9	5.51	3	4
3663867	alkaline shock protein	4836	4288	15825	89.7	88.74	4.82	119	112
3664006	50S ribosomal protein L27	120	245	9915	31.2	29.7	10.47	4	6
3664009	50S ribosomal protein L21	1392	47	11249	58.8	16.7	9.35	37	34
3664093	DNA-binding protein	485	532	20949	56.5	57.3	4.62	43	46
3664106	50S ribosomal protein L35	37	45	7610	29.2	28.5	12.24	2	3
3664184	GTP cyclohydrolase	38	48	22016	15.1	17.4	6.60	2	3
3664204	deoxyadenosine kinase	63	87	24758	33.8	36.2	5.23	4	2
3664225	heat-shock protein Hsp20	108	123	16737	55.2	43.7	4.69	9	7
3664342	phosphocarrier protein HPr	265	58	9402	55.7	29.5	5.09	9	8
3664517	50S ribosomal protein L13	3727	3180	16294	85.0	49.7	9.64	200	194
3664528	50S ribosomal protein L17	1090	942	14193	60.6	48.8	10.05	50	45
3664530	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	542	1262	34880	72.0	62.1	4.75	57	55
3664541	50S ribosomal protein L30	45	57	6553	58.3	60.1	11.05	2	3
3664542	30S ribosomal protein S5	5689	8723	17636	81.1	76.9	9.60	310	411
3664543	50S ribosomal protein L18	483	433	13035	66.1	32.2	10.27	21	18
3664544	50S ribosomal protein L6	3507	2588	19623	75.3	75.3	9.13	203	146
3664546	30S ribosomal protein S8	417	385	14527	53.8	52.1	9.48	11	9
3664549	50S ribosomal protein L24	122	143	10968	61.8	63.4	10.05	12	15
3664550	50S ribosomal protein L14	335	397	13136	58.2	59.4	9.99	11	13
3664551	30S ribosomal protein S17	189	194	10161	54.5	55.7	9.76	10	12
3664555	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L16	1554	1261	15996	52.8	62.5	10.88	75	58
3664556	30S ribosomal protein S3	7800	8946	24681	67.4	66.5	9.74	256	371
3664558	50S ribosomal protein L22	457	535	12387	73.9	74.6	10.73	13	14
3664560	30S ribosomal protein S19	196	143	10394	55.4	52.4	9.89	10	8
3664563	50S ribosomal protein L2	162	216	30451	13.2	49.1	10.64	7	9
3664564	50S ribosomal protein L23	466	376	11243	59.2	48.0	9.87	20	18
3664566	50S ribosomal protein L4	20463	9595	22277	73.4	73.4	9.99	532	277
3664567	50S ribosomal protein L3	2692	3028	23742	71.2	65.8	9.74	151	116
3664569	30S ribosomal protein S10	385	324	11770	78.4	75.3	9.99	20	20
3664573	elongation factor G	5503	6108	76723	70.1	61.9	4.77	222	212
3664584	TetR family transcriptional regulator	60	72	22776	37.0	27.0	9.30	7	3
3664702	potassium transporter Trk	56	67	24516	17.6	15.4	4.71	2	3
3664757	elongation factor P	1309	1502	20505	49.7	49.7	5.10	92	138
3664851	ferritin	282	300	18211	64.5	63.2	4.78	11	12
3664906	universal stress protein UspA	167	135	17158	67.1	68.3	6.36	8	6
3664939	ribonucleotide reductase	138	165	17491	29.0	28.4	4.70	8	9
3664953	universal stress protein UspA	3907	1221	17189	90.9	68.8	5.91	187	67
3665240	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S18	70	65	9148	14.1	15.1	11.48	2	2
3665243	50S ribosomal protein L9	1249	1228	16682	74.0	63.3	9.75	53	50

3665392	purine nucleoside phosphorylase	1287	1427	25735	69.1	46.2	5.26	65	60
3665397	two-component system response regulator	181	130	25720	38.0	46.7	4.87	9	4
3665424	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	2522	2312	16948	59.0	54.7	53.5	97	92
3665449	phosphoglyceromutase	11308	10209	26105	68.4	60.1	5.69	426	408
3665495	methionine sulfoxide reductase B	119	112	16091	23.2	23.1	6.14	7	7
3665652	RNA-binding protein	659	687	18365	50.6	51.4	7.31	38	40
3665658	cell division protein FtsH	319	249	77191	23.9	27.6	5.87	13	9
3665660	heat-shock protein Hsp33	70	67	33078	16.7	23.9	5.03	2	4
3665815	L-lactate dehydrogenase	3116	3183	34034	72.7	55.8	5.13	102	82
3665875	pyruvate kinase	4668	3976	51793	70.4	64.5	5.06	228	200
3666049	30S ribosomal protein S1	2126	2848	45968	86.5	67.3	4.98	117	150
3666054	transcriptional regulator	1206	964	9518	81.3	80.2	10.07	39	29
3666061	diacylglycerol kinase	204	99	18649	47.5	22.2	6.59	5	3
3666143	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	118	86	29442	45.3	36.6	4.84	13	5
3666262	GntR family transcriptional regulator	74	69	26574	18.0	22.3	9.01	3	2
3666281	ribose-5-phosphate isomerase A	473	318	25021	88.5	43.2	5.29	38	20
3666296	transcription termination/antitermination factor NusG	439	571	20276	66.1	50.0	5.10	16	21
3666299	50S ribosomal protein L11	249	265	14860	40.4	40.6	6.59	7	8
3666300	50S ribosomal protein L1	4759	7336	24669	75.7	67.4	6.62	164	192
3666309	50S ribosomal protein L10	1155	930	18127	80.1	71.1	4.86	49	37
3666310	50S ribosomal protein L7/L12	84	94	12348	30.6	30.4	4.42	2	3
3666336	DUF970 domain-containing protein	59	63	11866	50.5	50.1	6.73	7	7
3666351	UDP-glucose 4-epimerase	2746	3687	36575	90.3	72.8	5.12	117	125
3666386	protein translocase subunit SecA	80	104	90295	30.0	18.4	5.88	3	7
3666394	HPr kinase/phosphorylase	366	294	35466	38.8	42.5	6.41	28	14
3666398	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2287	3459	34081	85.5	79.3	5.88	126	138
3666416	hydrolase	68	61	24289	42.0	42.8	4.96	3	3
3666435	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	257	198	21420	34.5	34.5	5.21	22	12
3666452	phosphotransacetylase	2806	2782	34678	72.5	75.9	4.94	133	121
3666564	ATP synthase subunit b	2301	1864	19242	53.5	50.0	5.54	107	89
3666568	ATP synthase subunit alpha	1715	1967	55193	53.0	40.5	5.04	93	118
3666570	ATP synthase subunit gamma	881	807	34774	43.9	56.7	5.31	35	28
3666573	ATP synthase subunit beta	4317	4424	51600	88.6	83.2	4.82	166	173
3666575	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	67	53	15443	12.6	40.6	6.92	4	4
3666578	rod shape-determining protein MreB	651	794	35458	52.4	59.1	5.34	23	35
3666602	universal stress protein UspA	7026	6405	18005	87.7	66.7	66.32	256	225
3666632	30S ribosomal protein S4	5423	1794	22929	84.6	68.7	10.06	248	122
3666650	rod shape-determining protein Mbl	964	1011	34944	48.9	60.1	5.01	31	42
3666692	thioredoxin	65	61	11882	23.1	23.3	4.54	2	2
3666701	chemotaxis protein	489	435	16559	50.0	50.3	9.07	12	11
3666768	cell division protein FtsZ	387	305	44423	46.3	31.8	4.91	21	18
3666776	ADP-ribose pyrophosphatase	427	647	20814	45.4	56.8	5.26	28	21
3666825	competence protein ComE	51	57	18073	39.1	39.0	6.18	2	2
3666832	30S ribosomal protein S20	55	51	9238	39.3	39.5	10.37	3	3
3666833	30S ribosomal protein S15	49	54	10410	42.7	41.7	9.98	4	4
3666836	elongation factor Tu	13988	12640	43405	76.8	78.0	4.93	597	523
3666837	trigger factor	978	958	48717	56.0	52.8	4.45	38	40

3666838	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	112	235	45941	19.2	30.3	4.90	15	16
3666860	30S ribosomal protein S2	2146	2996	29639	80.5	80,9	5.13	143	147
3666861	elongation factor Ts	688	1211	31942	71.8	62,2	4.92	41	64
3666862	uridylate kinase	733	286	25860	65.8	52.1	5.70	34	25
3666876	hypothetical protein	439	90	18616	77.9	41.1	5.65	32	4
3666877	ArsR family transcriptional regulator	55	53	15529	56.4	56.5	9.30	6	6
3666880	peptidase U34	54	75	51560	10.0	16.2	5.78	3	2
3666925	terminase	42	48	72414	22.6	22.4	5.36	3	3
3666926	portal protein	28	25	43283	4.0	4.2	4.83	2	2
3666934	tail protein	550	570	25284	62.3	41.5	4.81	36	33
3666935	hypothetical protein	50	51	14826	38.6	38.6	9.08	4	4
3666943	lipase	46	48	42598	19.7	19.6	5.64	3	3
3666944	hypothetical protein	222	691	40647	45.0	49.1	5.51	11	30
3666953	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	103	174	44659	22.1	21.1	6.38	2	2
3666961	hypothetical protein	225	77	18620	23.7	23.7	4.84	6	2
3666968	antirepressor	345	389	30185	44.9	41.2	9.59	2	2
3667008	hypothetical protein	36	39	17787	40.3	40.1	6.09	5	5
3667015	peroxiredoxin	2895	2683	21028	61.0	64.7	4.84	117	92
3667025	peptidase U34	60	64	52635	11.1	11.0	5.02	3	3
3667028	glycerol kinase	42	48	55354	16.2	16.1	5.27	2	2
3667038	HxlR family transcriptional regulator	70	33	15459	50.8	34.1	4.33	6	2
3667039	transcriptional regulator	32	33	37936	3.3	18.3	9.10	2	2
3667083	phosphoglycerate kinase	968	835	30328	69.4	74.5	9.55	51	62
3667121	short-chain dehydrogenase	214	232	26373	43.1	41.9	5.25	10	7
3667130	triosephosphate isomerase	174	219	28359	60.9	34.0	5.29	31	14
3667132	aldo/keto reductase	70	40	35018	35.0	13.6	5.50	4	5
3667137	hypothetical protein	114	120	10955	38.9	38.5	9.49	3	4
3667138	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	1792	2346	49913	53.7	56.5	5.87	52	80
3667152	glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	323	137	32932	55.9	52.8	9.71	13	7
3667154	glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein	148	135	29340	21.1	21.4	7.12	4	4
3667176	tryptophanyl-tRNA synthase	66	149	38039	40.0	35.0	6.21	8	7
3667180	IpaB/EvcA family protein	323	46	36885	44.2	26.6	5.74	18	2
3667184	methionyl-tRNA synthetase	478	602	76590	41.3	33.2	5.41	25	27
3667187	ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	49	77	33019	13.5	39.7	8.70	2	6
3667189	metal ABC transporter substrate-binding protein	1223	1639	34058	74.6	57.1	6.72	41	55
3667190	ABC transporter ATPase	151	356	24970	49.3	37.7	5.97	17	18
3667193	purine operon repressor	502	404	30907	65.5	44.1	8.80	28	14
3667195	bifunctional protein GlmU	483	514	49979	33.2	25.9	5.91	21	13
3667197	ribose-phosphate pyrophosphokinase	490	465	36138	38.9	38.3	8.70	29	22
3667199	hypothetical protein	251	253	25903	37.6	32.7	8.98	10	10
3667200	sugar phosphate phosphatase	56	152	30446	14.3	41.0	4.61	2	7
3667209	DNA-directed RNA polymerase subunit delta	300	117	21626	27.0	26.5	3.72	10	5
3667210	CTP synthase	459	917	59563	54.7	43.6	5.22	32	38
3667234	membrane protein	389	77	21317	47.1	34.9	5.60	9	6
3667239	DEAD/DEAH box helicase	188	117	56488	52.2	31.3	7.92	17	11
3667251	cytosine deaminase	140	199	46383	14.6	19.9	5.51	7	8

3667258	hypothetical protein	56	47	10242	38.9	38.7	9.30	2	2
3667265	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	380	368	20451	57.2	65.0	5.29	16	17
3667268	lysyl-tRNA synthetase	212	169	58260	34.4	26.4	5.36	11	8
3667304	aspartate racemase	618	170	26747	58.5	54.7	5.03	38	17
3667307	nicotinate phosphoribosyltransferase	71	202	55575	13.3	13.9	5.41	5	6
3667309	nH(3)-dependent NAD+ synthetase	133	157	30521	52.0	44.7	5.06	6	5
3667314	beta-galactosidase	391	185	73513	35.0	28.3	4.77	23	18
3667315	beta-galactosidase	120	436	35662	32.3	34.2	4.90	7	10
3667318	phosphoglycerate mutase	51	58	28925	48.6	26.5	8.57	5	2
3667320	esterase	393	361	32681	41.3	42.0	5.55	19	14
3667321	cystathionine beta-lyase	841	451	41473	33.7	31.6	5.06	29	21
3667324	amino acid ABC transporter ATP- binding protein	760	692	27521	65.1	51.4	6.23	24	22
3667327	amino acid ABC transporter substrate- binding protein	1974	1633	28499	63.9	60.1	9.78	94	90
3667329	aminopeptidase C	346	402	51952	46.6	53.8	6.08	18	20
3667334	dUTP diphosphatase	552	483	20287	50.6	49.3	7.77	24	21
3667343	rRNA methyltransferase	178	139	27263	46.2	36.9	7.17	7	6
3667360	large-conductance mechanosensitive channel	131	125	13765	33.3	33.4	9.40	5	5
3667367	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	3455	4658	97127	53.0	48.1	6.21	205	256
3667369	ribonucleoside-diphosphate reductase	724	664	39224	68.1	55.8	4.58	38	34
3667371	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	814	984	82686	49.8	40.7	5.19	57	70
3667383	thymidylate kinase	91	58	24183	29.6	21.6	5.05	4	3
3667390	16S rRNA (cytidine(1402)-2~-O)- methyltransferase	34	39	32583	12.8	12.6	5.96	2	2
3667393	exopolyphosphatase	52	51	57438	10.1	20.4	6.36	2	2
3667402	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein TsaB	75	56	26789	54.8	25.3	6.31	11	2
3667405	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	37	67	37430	14.6	22.4	5.19	2	3
3667422	transcriptional regulator	228	186	23925	57.9	43.0	9.12	11	10
3667426	molecular chaperone GroEL	8220	7149	57088	85.8	84.1	4.71	277	243
3667436	sigma-54 modulation protein	8501	9896	21131	71.4	48.4	5.86	376	392
3667443	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	59	66	36882	11.2	37.9	7.03	3	8
3667450	thioredoxin reductase	213	66	33285	47.1	41.9	4.68	8	7
3667456	phosphoglucomutase	669	323	63667	33.6	34.1	5.04	33	23
3667464	protein of hypothetical function UPF0052 and CoFD	60	82	36176	29.0	10.1	5.70	6	3
3667482	exoribonuclease R	32	34	91810	3.6	10.4	6.05	2	2
3667490	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	264	340	32369	54.7	54.7	4.77	13	16
3667497	phosphoglucosamine mutase	410	214	48872	29.0	47.9	4.80	13	15
3667498	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	515	290	66570	35.6	33.3	4.97	14	15
3667503	hypothetical protein	715	381	30187	64.9	39.9	5.33	30	12
3667508	acetyltransferase	32	40	22737	16.7	11.8	5.48	3	3
3667509	glucose-6-phosphate isomerase	394	441	50319	58.0	48.9	4.97	34	33
3667515	ornithine carbamoyltransferase	2007	2504	37536	70.1	63.6	5.33	104	118
3667516	carbamate kinase	669	666	32988	50.6	50.6	5.36	30	23
3667520	copper-binding protein	51	58	10608	37.9	37.4	7.74	4	4
3667540	arginine deiminase	106	88	46214	25.6	38.8	5.39	7	6
3667546	glutamine amidotransferase	29	35	26118	20.4	20.6	5.73	4	4

3667548	thymidine kinase	76	29	22156	15.7	12.6	8.54	5	3
3667551	translation factor Sua5	112	71	37238	20.8	29.2	7.19	4	3
3667552	serine hydroxymethyltransferase	129	91	44923	26.8	32.6	5.97	8	12
3667559	ATP synthase subunit delta	1051	818	20456	71.7	60.0	5.68	74	55
3667566	glycine cleavage system protein H	27	34	10634	21.6	20.9	4.36	2	2
3667568	D-alanine--D-alanine ligase	1171	1136	42485	80.4	68.8	4.94	57	62
3667574	glyoxal reductase	46	48	32063	23.2	23.1	5.93	2	2
3667592	aminotransferase V	156	162	42072	40.6	38.5	6.04	14	18
3667603	NADH dehydrogenase	71	125	44004	22.0	19.6	5.74	4	8
3667606	rod shape-determining protein MreC	60	48	31124	28.1	17.5	9.96	1	3
3667608	polar amino acid ABC transporter ATP-binding protein	46	42	23912	34.7	34.6	5.60	4	4
3667620	protein RecA	247	302	39039	31.2	42.3	5.37	12	17
3667626	Holliday junction DNA helicase RuvA	281	55	22285	44.7	20.1	6.62	14	6
3667630	preprotein translocase subunit YajC	180	117	16374	30.5	9.1	4.87	6	4
3667637	alanyl-tRNA synthetase	45	155	98457	14.1	30.9	5.14	3	14
3667643	glutamate racemase	56	123	28902	25.5	37.5	5.98	4	16
3667645	non-canonical purine NTP pyrophosphatase	922	424	21273	73.3	34.9	6.65	47	16
3667651	hypothetical protein	2742	1430	16469	78.9	80.9	4.43	66	48
3667653	catabolite control protein A	95	166	36700	28.6	49.4	4.95	10	10
3667655	transcriptional regulator	822	1025	27144	71.8	56.0	4.70	47	35
3667662	DNA methyltransferase	92	81	31135	17.0	21.3	6.31	4	4
3667663	acetate kinase	2247	2656	43568	64.6	56.0	5.39	127	109
3667665	haloacid dehalogenase	38	42	28487	30.1	30.0	6.78	2	2
3667687	thiamine-phosphate synthase	59	65	23834	32.6	32.2	5.25	3	3
3667749	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase	356	261	16766	39.9	39.9	8.53	29	14
3667751	3-oxoacyl-ACP synthase III	74	76	34889	28.5	30.9	6.30	5	6
3667755	ACP S-malonyltransferase	156	117	35583	47.8	48.4	6.32	12	8
3667757	3-ketoacyl-ACP reductase	1287	916	26457	43.0	57.4	8.95	50	44
3667758	3-oxoacyl-ACP synthase	490	347	42678	42.9	37.1	5.82	22	14
3667760	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	150	212	17101	54.0	48.7	4.63	5	8
3667761	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase	817	874	15814	72.9	72.2	8.74	36	39
3667767	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	92	135	28431	14.7	20.2	9.03	6	9
3667768	enoyl-ACP reductase	574	945	27375	44.1	50.8	7.66	27	51
3667771	DSBA oxidoreductase	219	130	24551	33.0	22.8	5.33	11	9
3667772	alpha/beta hydrolase	49	110	34971	20.2	47.8	5.07	5	12
3667785	hypothetical protein	74	68	13520	15.8	15.7	9.91	2	2
3667788	nucleoside deoxyribosyltransferase	284	324	18190	63.1	63.3	4.55	20	21
3667808	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	138	114	65568	29.6	15.1	4.87	8	8
3667851	hypothetical protein	132	128	32208	50.3	50.1	4.96	7	7
3667865	RNA methyltransferase	77	178	44818	17.3	21.9	6.34	5	5
3667927	Fe-S cluster assembly protein SufD	74	77	48052	27.0	23.3	5.31	6	5
3667939	dihydroxynaphthoic acid synthetase	39	95	30000	26.0	11.4	5.49	4	2
3667949	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	239	221	16627	36.2	36.4	4.85	8	8
3667951	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	61	72	43900	15.8	15.5	5.42	5	5
3667952	riboflavin synthase subunit alpha	684	761	21580	48.5	43.0	5.18	69	59

3667954	bifunctional diaminohydroxyphosphoribosylaminop yrimidine deaminase/5-amino-6-(5- phosphoribosylamino)uracil reductase	48	161	39634	13.2	35.5	9.33	3	4
3667955	ribonucleoside hydrolase	146	236	34713	36.3	34.4	4.62	14	20
3668013	hypothetical protein	45	60	20413	21.0	53.0	4.59	3	7
3668014	hypothetical protein	530	926	23774	57.7	55.3	5.33	27	39
3668021	phage capsid protein	146	593	39322	35.2	54.7	5.11	5	21
3668034	primosomal replication protein N	67	86	34361	22.1	21.1	8.70	2	4
3668036	DNA recombination protein RecT	106	174	34741	14.6	23.6	4.80	3	3
3668044	antirepressor	345	389	28717	59.5	50.2	9.76	9	7
3668049	hypothetical protein	43	39	14790	38.1	38.2	9.13	2	2
3668052	hypothetical protein	185	152	31051	23.2	21.4	4.71	6	3
3668059	gluconokinase	74	71	55382	25.3	25.4	5.37	6	6
3668076	pyrophosphatase	406	552	34173	37.6	43.1	4.70	23	30
3668091	ribosome biogenesis GTPase A	73	63	32542	37.9	35.9	8.74	8	4
3668100	hypothetical protein	206	308	30723	34.6	52.1	5.93	9	13
3668103	ABC transporter ATP-binding protein	45	52	72749	18.9	18.7	5.45	3	3
3668107	cytidylate kinase	420	358	24999	58.8	57.0	8.72	15	15
3668112	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	213	37	26677	38.7	25.2	9.62	8	6
3668113	SMC-Scp complex subunit ScpB	100	50	22527	27.4	15.4	4.61	6	5
3668116	S1 RNA-binding protein	89	142	33366	18.8	38.6	6.12	5	7
3668123	amino acid aminotransferase	703	839	43080	57.6	41.6	5.07	39	51
3668124	RNA polymerase sigma factor RpoD	224	236	43359	32.1	34.5	5.51	13	11
3668126	glycine--tRNA ligase subunit beta	578	601	78488	50.4	36.6	4.87	39	31
3668127	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	65	104	37820	26.8	23.5	5.43	1	5
3668129	GTPase Era	175	119	33769	45.8	52.5	8.78	8	8
3668131	phosphate starvation protein PhoH	45	41	37444	19.1	20.4	6.63	4	4
3668134	argininosuccinate lyase	277	291	51887	41.6	34.1	5.47	19	10
3668136	choloyleglycine hydrolase	1640	1834	36082	86.5	80.6	5.04	61	75
3668144	ABC transporter ATP-binding protein	27	61	27575	20.2	29.6	5.56	6	3
3668146	aspartate--tRNA ligase	527	926	68388	37.7	49.7	5.01	24	32
3668151	16S rRNA methyltransferase	84	95	26752	35.8	34.7	5.48	3	3
3668152	ribosomal protein L11 methyltransferase	43	43	34945	16.6	7.8	5.06	2	2
3668160	hypothetical protein	634	255	17350	62.5	54.6	9.04	27	11
3668161	hypothetical protein	102	127	16639	22.1	8.7	4.22	3	3
3668167	elongation factor 4	51	51	68021	6.7	24.2	5.15	2	7
3668169	molecular chaperone DnaK	609	438	67171	55.7	25.0	4.78	30	23
3668171	protein GrpE	105	75	21417	36.8	27.4	6.46	7	6
3668184	transcription termination factor NusA	394	494	44498	39.0	37.0	4.61	19	21
3668186	ribosome maturation protein RimP	34	42	18772	22.2	25.4	4.75	2	2
3668190	proline--tRNA ligase	486	356	64217	53.4	47.7	4.84	26	40
3668195	ribosome-recycling factor	1227	1714	20771	73.3	75.4	5.16	60	74
3668240	GTP-binding protein	445	455	22628	53.1	55.1	8.92	21	33
3668244	RNase J family beta-CASP ribonuclease	83	101	66679	19.5	22.9	6.79	6	8
3668252	phosphopantetheine adenylyltransferase	236	150	19349	48.0	50.3	5.28	15	7
3668255	rRNA methyltransferase	91	202	20837	31.6	21.9	9.14	2	3

3668260	GTP-binding protein	481	727	68785	37.9	41.2	5.15	44	36
3668265	dihydrolipoamide dehydrogenase	2094	3938	50694	54.5	51.6	5.10	105	162
3668266	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	2973	3639	48342	73.4	78.2	4.72	116	121
3668267	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	5994	5408	35221	72.3	71.5	5.04	260	145
3668269	peptide deformylase	56	74	20885	32.8	25.8	5.97	9	12
3668272	diacylglycerol kinase	43	52	35128	19.0	18.7	9.03	2	2
3668286	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	41	56	38251	13.1	18.4	5.19	2	2
3668288	amino acid aminotransferase	33	35	42965	17.0	10.7	5.36	2	2
3668290	4-hydroxy-tetrahydronicotinate reductase	26	117	27915	18.1	23.5	4.93	2	3
3668295	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase	105	94	24861	11.4	11.9	4.75	3	3
3668302	ribose-phosphate pyrophosphokinase	387	548	36038	67.0	74.4	5.77	20	34
3668305	hypothetical protein	481	388	26105	54.6	36.1	6.15	33	28
3668306	phosphoglycerate mutase	194	96	24778	51.8	36.2	6.51	14	6
3668307	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	61	36	42742	19.9	17.2	5.58	11	6
3668309	cysteine desulfurase	375	480	42455	24.7	27.6	5.05	9	8
3668310	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	360	169	24671	53.7	48.5	4.67	14	7
3668313	cell division protein DivIVA	352	398	27575	35.8	39.8	4.53	14	12
3668317	cell division protein FtsA	36	34	50454	12.3	13.3	5.55	3	3
3668321	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	55	105	40581	34.1	34.3	9.11	5	10
3668324	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	115	132	50301	16.9	14.9	5.49	6	6
3668337	hypothetical protein	194	532	37878	31.3	57.6	5.29	14	14
3668359	hypothetical protein	43	47	31866	6.9	7.8	5.38	2	2
3668365	ribosome maturation factor RimM	32	37	19208	23.2	23.2	4.67	2	2
3668369	signal recognition particle protein	49	126	54079	29.5	34.7	9.42	5	5
3668374	chromosome segregation protein SMC	36	48	135117	8.5	9.4	5.70	5	5
3668375	phosphate acyltransferase	25	35	36952	21.6	35.9	6.28	5	4
3668391	methionyl-tRNA formyltransferase	93	60	34707	43.8	29.0	5.70	4	3
3668408	bifunctional protein FOLD	57	65	30406	42.3	29.7	8.52	5	4
3668415	YggS family pyridoxal phosphate enzyme	171	60	26978	36.6	30.6	5.75	3	7
3668423	hypothetical protein	37	48	19518	42.9	39.8	5.62	6	6
3668425	hypothetical protein	50	42	38874	23.7	27.9	4.34	5	5
3668432	aspartate aminotransferase	107	113	43340	14.2	14.5	5.46	5	5
3668434	glutamate--tRNA ligase	302	415	58313	34.9	37.9	5.35	16	28
3668435	glutamine synthetase	1371	1747	50803	49.9	56.4	5.36	40	48
3668438	sulfurtransferase	544	523	16232	36.0	36.4	9.75	16	16
3668439	glucokinase	2838	3405	34399	63.8	55.1	4.99	123	101
3668444	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	378	196	21102	55.4	39.1	4.96	20	11
3668445	penicillin-binding protein	63	82	76061	6.2	15.3	9.27	2	4
3668448	heme biosynthesis protein HemY	39	36	14498	20.2	20.7	4.45	2	2
3668449	uridine kinase	278	102	25119	62.8	34.4	5.26	13	12
3668452	phenylalanine--tRNA ligase subunit beta	191	148	88948	26.7	22.6	4.92	14	12
3668455	phenylalanine--tRNA ligase subunit alpha	96	140	39002	29.6	25.3	5.63	7	6

3668462	23S rRNA methyltransferase	129	99	28292	27.9	20.5	5.23	4	4
3668474	two-component system response regulator	113	88	26314	51.3	28.1	4.99	26	18
3668483	GTPase	48	39	42262	18.9	10.1	6.47	2	2
3668485	50S ribosomal protein L20	862	924	13506	46.2	45.8	10.95	34	36
3668486	translation initiation factor IF-3	2205	1323	19475	46.5	46.5	10.35	75	50
3668487	primosomal protein DnaI	65	58	35825	16.3	16.7	7.75	3	3
3668498	DSBA oxidoreductase	44	57	23449	14.0	33.0	4.38	2	2
3668507	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	72	87	24659	41.8	41.4	5.64	10	10
3668513	peptidylprolyl isomerase	570	907	34642	50.6	64.1	9.60	21	23
3668516	hypothetical protein	42	38	14087	22.0	22.1	4.89	2	2
3668521	arginine--tRNA ligase	2336	2083	63839	64.6	61.0	5.35	118	114
3668522	phosphomethylpyrimidine kinase	1060	826	29299	66.1	64.9	4.95	40	30
3668523	L-lactate dehydrogenase	112	168	33333	17.0	23.7	5.79	2	2
3668535	ribokinase	707	1071	32021	69.7	87.0	4.80	70	64
3668542	dipeptidase PepV	427	699	51188	57.6	52.9	4.70	29	26
3668543	carbohydrate kinase	77	261	30530	29.0	38.8	5.35	6	17
3668546	leucine--tRNA ligase	32	289	92860	14.6	20.6	5.21	3	11
3668547	S-adenosylmethionine synthase	39	88	43169	10.1	19.7	4.84	2	4
3668559	aldo/keto reductase	55	45	30832	36.9	28.1	5.46	3	4
3668564	phosphoenolpyruvate carboxykinase	3200	3694	64709	68.0	62.2	4.91	139	156
3668582	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein	76	82	81816	24.0	23.8	5.38	6	6
3668627	transcriptional regulator	45	39	54613	18.2	18.4	9.20	5	5
3668648	hypothetical protein	115	115	19681	13.8	13.8	8.65	3	4
3668649	hydrolase Nlp/P60	251	261	48985	21.0	26.5	4.95	14	13
3668650	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	891	439	58147	47.9	28.8	4.74	27	24
3668652	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase	414	325	55856	34.3	21.7	5.43	16	21
3668660	LPS biosynthesis protein	343	383	22752	34.9	45.9	9.78	11	10
3668681	aminotransferase	128	132	42306	26.3	29.8	4.92	6	6
3668684	methionine aminopeptidase	312	345	31646	40.4	27.4	5.24	15	9
3668692	oxidoreductase	127	232	38248	9.1	11.2	4.99	4	4
3668710	nitroreductase	639	412	24737	49.3	37.6	5.28	29	15
3668713	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	32	56	48967	14.0	12.2	5.00	3	3
3668730	hypothetical protein	47	41	20593	25.6	25.2	5.75	3	3
3668754	aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	346	397	53391	42.6	58.6	5.34	13	25
3668756	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	403	548	52977	32.2	51.6	4.90	22	26
3668763	ATP-dependent DNA helicase PcrA	139	121	86238	10.3	10.7	5.63	9	9
3668766	xanthine phosphoribosyltransferase	280	231	21100	60.7	40.8	5.97	28	29
3668771	30S ribosomal protein S9	277	321	14485	55.6	56.1	10.84	12	13
3668778	30S ribosomal protein S13	124	138	13678	76.0	76.8	10.60	13	13
3668780	adenylate kinase	1171	677	24593	69.4	63.0	5.39	52	39
3668782	50S ribosomal protein L15	3516	2856	15437	72.9	73.6	10.59	158	134
3668784	50S ribosomal protein L5	7709	7674	20159	87.8	89.4	8.73	492	383
3668788	30S ribosomal protein S7	754	795	17974	73.7	73.4	9.73	59	59
3668789	30S ribosomal protein S12	643	567	15494	59.7	37.4	11.01	35	33
3668793	DNA-directed RNA polymerase subunit beta~	129	43	135339	19.2	18.2	7.05	10	3
3668795	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein	49	140	92871	24.8	28.2	6.31	8	12

3668796	alcohol dehydrogenase	6168	8424	36102	82.5	71.1	5.82	339	375
3668798	deoxyadenosine kinase	99	79	24632	48.4	43.2	5.03	4	2
3668816	universal stress protein UspA	215	189	17559	39.2	39.4	6.85	7	7
3668818	arginine ABC transporter ATP-binding protein	64	46	27469	41.1	15.4	6.00	3	3
3668839	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein	2631	1682	20981	41.6	31.1	4.69	67	40
3668855	cytochrome C	347	767	50100	61.4	44.0	5.79	21	36
3668857	fumarate hydratase	643	460	50280	54.1	50.4	4.93	36	17
3668860	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	466	282	22185	41.6	35.5	5.15	17	8
3668868	aldose 1-epimerase	197	398	37903	34.8	45.2	4.83	10	14
3668890	esterase	415	161	26611	64.3	31.9	4.94	25	9
3668895	NAD(P)H dehydrogenase	150	160	20088	32.4	35.8	5.22	10	5
3668897	cysteine synthase	232	92	32582	55.3	23.7	5.09	6	6
3668907	hypothetical protein	645	516	67673	49.7	17.1	5.67	37	38
3668909	NADPH-flavin oxidoreductase	346	216	28845	36.4	21.3	5.98	17	10
3668976	hypothetical protein	55	47	17131	18.2	18.4	9.64	2	2
3668977	peptidoglycan-binding protein LysM	50	54	37487	7.6	7.4	4.13	2	2
3668981	rRNA methyltransferase	1241	1311	31785	73.8	66.6	5.82	68	71
3669019	phosphoglycerate mutase	113	84	24272	34.6	19.4	5.16	5	2
3669047	prolyl aminopeptidase	113	114	34819	25.7	23.1	4.97	7	3
3669050	haloacid dehalogenase	275	108	24065	60.6	40.4	5.13	19	14
3669058	ferredoxin--NADP reductase	67	36	35769	12.3	13.0	5.09	2	2
3669060	inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	1124	1937	34884	43.8	51.3	4.75	60	77
3669062	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	1263	1510	26908	77.3	67.7	5.35	54	72
3669075	alcohol dehydrogenase	39	44	34899	10.4	10.3	5.13	2	2
3669082	lipoate-protein ligase A	887	1106	38450	59.9	58.5	5.21	52	41
3669088	alpha/beta hydrolase	32	48	27476	7.3	7.6	5.72	2	2
3669092	phosphoketolase	18421	31829	91346	64.9	69.7	5.09	1157	1683
3669096	aminoacyl-tRNA deacylase	38	59	18636	16.7	38.7	8.60	2	4
3669097	peptidase C69	73	260	54260	31.2	35.8	5.17	6	14
3669102	lactate dehydrogenase	2496	3777	37335	87.7	81.4	4.81	145	176
3669106	membrane protein	50	49	14466	31.7	31.8	10.15	2	2
3669120	delta-aminolevulinic acid dehydratase	136	198	35817	35.3	53.9	5.57	17	14
3669146	cobalt-precorrin-4 C(11)-methyltransferase	82	77	27854	45.8	33.2	5.40	9	4
3669148	cobalt-precorrin-6Y C(15)-methyltransferase	69	45	20375	19.0	9.8	7.96	2	2
3669160	cobalamin adenosyltransferase	90	32	21858	40.4	38.3	6.43	9	3
3669162	FMN reductase	83	74	31408	28.9	17.5	6.10	4	2
3669164	flavodoxin	116	216	16330	20.1	27.5	4.22	2	4
3669166	ethanolamine utilization protein EutP	41	37	15711	13.4	13.7	7.74	2	2
3669174	acetate kinase	67	96	43775	17.8	29.9	5.90	5	3
3669177	aldehyde dehydrogenase	808	657	51095	46.3	35.0	5.29	26	20
3669179	ATP--cob(I)alamin adenosyltransferase	1811	1667	16893	47.8	58.0	5.24	65	54
3669186	phosphate propanoyltransferase	242	117	23947	69.2	50.0	6.36	19	14
3669197	propanediol dehydratase	476	501	25792	59.7	57.2	5.34	23	24
3669198	propanediol dehydratase large subunit	727	873	62052	53.2	44.8	4.74	42	49
3669200	propanediol utilization protein PduB	573	762	24929	48.3	29.0	5.20	32	27

3669212	tRNA synthetase subunit beta	594	622	27274	54.4	47.7	4.74	20	22
3669217	hypothetical protein	187	239	19370	53.4	43.7	4.50	8	10
3669219	multidrug ABC transporter ATPase	261	151	31717	27.5	30.7	5.11	13	9
3669232	AsnC family transcriptional regulator	37	47	17747	10.9	11.3	6.30	2	2
3669241	peptidase S24	73	76	54892	21.3	18.4	5.54	4	4
3669261	cysteine synthase	2301	1909	32221	87.0	88.6	5.66	106	102
3669271	peptidase M13	722	292	72345	37.2	31.7	5.23	27	11
3669317	histidine decarboxylase	916	995	34056	48.2	25.4	4.80	59	40
3669323	fructose 2,6-bisphosphatase	219	111	24646	45.6	16.1	5.49	10	5
3669325	glycerol dehydrogenase	4446	4371	40673	59.2	55.0	4.93	182	146
3669336	NAD(P)H-hydrate epimerase	161	331	22416	41.0	37.7	4.89	8	11
3669338	hypothetical protein	154	124	19292	8.5	12.0	5.54	2	3
3669346	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase	2089	2175	60411	50.0	46.3	9.52	98	104
3669358	alcohol dehydrogenase	44	57	35895	23.8	30.4	5.00	4	8
3669387	HxlR family transcriptional regulator	54	79	17217	18.7	24.3	9.17	2	2
3669392	aminopeptidase	431	806	50819	40.0	49.3	5.55	23	28
3669394	NAD-dependent dehydratase	921	969	23173	73.2	45.1	4.98	46	48
3669396	aminopeptidase N	102	994	95265	26.0	38.6	4.74	11	31
3669410	glutamine amidotransferase	48	54	25338	20.2	19.7	5.39	2	2
3669418	hypothetical protein	35	36	35886	15.9	16.2	7.78	2	2
3669452	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	972	207	20394	70.8	60.1	4.62	46	17
3669468	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	3478	4009	32351	71.4	64.8	5.02	199	158
3669479	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein	40	50	71874	25.8	21.8	6.13	3	6
3669490	DNA gyrase subunit A	66	179	92834	13.1	25.4	5.48	3	12
3669492	single-stranded DNA-binding protein	114	239	20536	43.9	37.4	4.69	25	32
3669525	NADPH-dependent FMN reductase	449	336	20216	67.8	43.3	9.42	26	19
3669531	pyrroline-5-carboxylate reductase	1549	1110	29362	49.3	36.3	5.28	44	37
3669548	peroxiredoxin	162	154	15714	31.0	31.3	5.89	4	4
3669555	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein	17769	18620	82255	83.2	69.8	5.13	812	965
3669568	acetyl-CoA acetyltransferase	48	42	41030	15.8	15.7	5.75	4	4
3669571	maltose phosphorylase	9333	1212	86691	35.1	38.0	4.93	54	62
3669573	beta-phosphoglucomutase	520	250	23965	73.2	48.6	4.59	19	12
3669587	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	824	469	32600	68.1	52.8	5.25	55	21
3669595	GMP reductase	1531	1113	35937	68.5	59.6	6.46	76	59
3669597	adenylosuccinate synthetase	1092	1257	47695	56.9	56.5	5.43	57	48
3669598	hypothetical protein	119	121	29474	13.0	18.4	5.38	3	3
3669634	FMN reductase	902	1293	21491	45.3	55.3	5.64	28	55
3669636	FMN reductase	276	256	45646	17.3	17.8	4.67	19	13
3669649	serine--tRNA ligase	177	145	49260	40.9	34.7	5.60	32	63
3669654	peptide ABC transporter ATP-binding protein	240	254	27504	32.0	32.4	5.50	6	6
3669659	ribonucleoside hydrolase	863	1207	32552	56.0	49.2	4.70	58	62
3669661	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	127	298	32911	38.1	50.0	4.97	7	6
3669663	ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	141	194	26523	34.1	34.8	6.92	9	10
3669667	chromosome partitioning protein ParB	94	62	33155	12.2	16.0	9.77	2	2

3669679	phosphopentomutase	112	556	43975	50.1	48.1	4.97	10	21
3669685	inosine-5-monophosphate dehydrogenase	450	453	39349	67.9	73.2	5.31	22	30
3669688	two-component system sensor histidine kinase	43	59	43256	4.2	4.4	7.25	2	2
3669699	dihydroorotate dehydrogenase	99	252	32716	38.3	24.0	9.11	6	7
3669700	orotidine 5~-phosphate decarboxylase	120	80	26951	36.7	45.2	5.91	4	5
3669702	orotate phosphoribosyltransferase	660	547	23419	63.8	58.5	7.90	56	52
3669704	phosphatase	291	190	24262	50.2	35.6	5.14	12	9
3669710	formate--tetrahydrofolate ligase	9872	13528	60214	68.0	52.8	5.48	430	539
3669712	acetolactate synthase	443	334	60957	37.7	30.6	5.14	15	22
3669715	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	580	367	42402	38.3	40.1	5.82	21	23
3669716	adenylosuccinate lyase	1155	1689	49423	62.2	49.0	5.86	80	82
3669718	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	7735	6878	27291	73.6	74.9	5.72	308	249
3669722	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurQ	2510	3062	24716	62.4	36.7	5.77	163	169
3669724	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL	3716	4077	80894	49.3	48.9	4.75	143	150
3669727	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	1486	2854	36952	67.5	67.0	5.68	110	110
3669728	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	420	302	21150	77.9	30.0	5.85	45	19
3669729	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	9456	10043	56997	81.6	72.9	5.43	480	531
3669731	phosphoribosylamine--glycine ligase	383	896	45731	43.7	49.4	5.38	21	45
3673063	bifunctional protein PyrR	159	124	20108	65.2	50.6	5.44	26	9
3673220	pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha	5706	6409	40977	72.3	74.5	5.35	249	242
3673234	hypothetical protein	139	145	8125	60.0	59.2	10.78	11	11
3673346	oxidoreductase ion channel protein lolS	195	234	36274	45.0	33.3	5.04	9	8
3674025	acyl carrier protein	337	374	9266	37.5	37.8	3.90	19	19
3675625	50S ribosomal protein L19	159	145	13809	58.0	58.4	11.17	15	15
3676152	uracil phosphoribosyltransferase	1627	1770	23302	78.7	68.7	5.65	81	102
4562477	asparagine synthase	175	392	74531	30.7	29.6	5.48	12	18
11953351	two-component system response regulator	42	37	26849	26.4	39.6	5.25	2	5
11953356	1,3-propanediol dehydrogenase	3895	3595	42153	60.8	59.2	5.54	180	170
11953357	sulfurtransferase	63	30	29335	49.6	9.7	5.18	7	2
11953361	glutamine amidotransferase	147	397	26601	7.4	9.9	6.10	2	10
11953367	deoxyribose-phosphate aldolase	1240	1219	24227	60.7	66.1	4.93	55	41
11953372	alpha-acetolactate decarboxylase	47	36	26336	14.7	7.1	4.78	2	2
11953375	tyrosine--tRNA ligase	37	74	47187	7.5	24.5	5.48	2	6
11953377	NADH-flavin reductase	6332	7029	23712	58.3	57.9	6.45	214	221
11953379	L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase	600	1284	33951	76.8	73.5	5.31	36	41
11953390	peptidyl-tRNA hydrolase	68	54	20517	26.9	25.4	5.96	5	5
11953404	ribokinase	72	102	32406	6.8	13.1	4.75	2	2
11953416	oxalyl-CoA decarboxylase	84	123	62255	17.2	24.0	5.36	4	6
11953421	phosphoesterase	48	54	35378	19.4	19.3	4.95	4	4
11953422	DEAD/DEAH box helicase	116	95	52568	14.7	23.2	9.95	4	5
11953424	phosphodiesterase	337	333	19373	36.6	43.6	5.43	21	19
11953438	D-aminoacyl-tRNA deacylase	31	47	15986	10.3	11.0	5.13	2	2
11953439	argininosuccinate synthase	368	476	45366	44.9	44.9	5.13	23	36
11953441	SAM-dependent methyltransferase	47	58	26315	22.6	32.3	5.33	2	2

11953444	hypothetical protein	54	66	48727	9.5	7.8	4.41	3	2
11953446	hypothetical protein	1927	1214	14776	66.7	51.9	4.42	91	82
11953455	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	60	261	44665	30.1	28.3	6.60	3	3
11953467	phosphohydrolase	44	53	25170	19.7	18.9	5.64	3	3
11953468	GNAT family acetyltransferase	2041	1578	19977	63.8	56.0	4.90	82	76
11953496	phage capsid protein	992	1720	43488	59.8	67	5.19	69	76
11953503	hypothetical protein	165	344	61378	35.5	26.4	4.53	16	16
11953505	exonuclease SbcC	59	77	35175	29.5	21.0	4.83	4	3
11953512	haloacid dehalogenase	84	48	20262	51.7	46.0	9.15	9	3
11953515	universal stress protein A	5509	4955	17943	75.2	81.8	5.51	193	139
11953527	UDP-galactopyranose mutase	163	306	43487	39.8	36.3	5.63	11	13
11953528	glutamate--cysteine ligase	41	44	59207	12.0	12.6	5.05	2	2
11953536	acetoin reductase	4726	8043	27054	77.0	75.5	4.94	160	228
11953543	peroxidase	736	861	36068	45.2	48.1	5.00	28	26
11953545	PhoU family transcriptional regulator	52	64	26623	28.2	27.9	5.07	2	2
11953557	GMP synthase	87	226	57660	14.9	25.3	5.13	4	11
11953561	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding subunit	7095	10369	36543	90.3	89.4	4.80	228	273
11953574	precorrin-8X methylmutase	170	67	25304	42.3	47.1	7.10	10	7
11953576	alcohol dehydrogenase	955	1336	40335	44.2	57.4	5.76	32	48
11953577	ATP--cobalamin adenosyltransferase	261	46	22861	36.9	42.6	7.63	5	6
11953578	hypothetical protein	527	458	19803	68.6	63.0	9.10	17	15
11953580	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1539	2363	56338	79.9	75.7	5.81	103	115
11953581	6-phosphogluconate dehydrogenase	11019	10546	53365	81.8	83.9	5.54	442	436
11953583	transcription elongation factor GreA	37	48	18943	15.8	17.1	6.60	2	2
11953599	threonyl-tRNA synthetase	2414	2977	68722	68.6	54.1	5.20	79	114
11953603	asparagine--tRNA ligase	128	302	50061	45.6	50.7	5.03	15	21
12390487	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	60	74	44927	11.8	15.4	5.46	2	2
12390507	excinuclease ABC subunit B	61	54	76986	18.9	25.8	5.26	2	3
12390531	UDP pyrophosphate synthase	37	48	29311	28.6	22.0	6.25	5	4
12390570	phosphomethylpyrimidine kinase	141	117	29118	29.4	22.8	5.71	5	5
12390623	propanediol dehydratase small subunit	234	299	19176	51.4	52.6	5.78	13	15
35152443	DNA gyrase subunit B	69	86	71281	23.5	17.8	5.72	11	4
35164171	neopullulanase	64	262	67374	16.3	17.0	5.50	5	10
35164302	hypothetical protein	50	58	81761	22.6	25.1	5.69	11	16
48569017	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	519	523	15993	54.9	32.4	4.53	21	31

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

El cinc (Zn^{2+} y ZnONPs) como aditivo en la industria alimentaria.

Evaluación de los riesgos asociados al uso de ZnONPs en el desarrollo de envases activos.

El cinc es un elemento traza esencial para el buen desarrollo del organismos. Su deficiencia puede originar problemas de salud tales como: afecciones en la piel, alteraciones en el sentido del gusto, anorexia, dificultad en la cicatrización de las heridas y/o alteraciones inmunológicas. Los estados carenciales de cinc tienen especial incidencia durante el crecimiento y desarrollo infantil, ya que este nutriente juega un papel primordial en la expresión genética, en la regulación del crecimiento y en el desarrollo de la respuesta inmune. Una de las principales causas de los bajos niveles de Zn en el organismo es la ingesta de alimentos en los que la biodisponibilidad de este elemento es baja. Aunque, en un principio, la leche materna constituye la principal fuente de alimentación durante los primeros meses de vida, frecuentemente es necesario el empleo de fórmulas infantiles para satisfacer los requerimientos nutricionales de los lactantes. Sin embargo, en ciertas ocasiones, la forma química en la que este elemento es adicionado a las fórmulas infantiles, junto con su interacción con los demás componentes de este producto, hace que su biodisponibilidad no sea adecuada, aumentando el riesgo de la aparición de enfermedades relacionadas con su deficiencia. Dada la importancia de este elemento para el crecimiento y desarrollo infantil, en el primer **trabajo presentado en este capítulo (Artículo 3) y que lleva por título “Availability of zinc from infant formula by *in vitro* methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry” (J. Dairy Sci., 2016, 99, 9405-9414)**, se ha estudiado la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de cinc en distintos tipos de fórmulas infantiles: basadas en leche de vaca y en leche de soja. Dentro de aquellas basadas en leche de vaca se evaluaron fórmulas preparadas sin lactosa, para lactantes con alergias e intolerancias a la lactosa, con proteínas hidrolizadas y enriquecidas con distintos nutrientes. La bioaccesibilidad y biodisponibilidad del Zn en las formulas infantiles se llevó a cabo empleando modelos *in vitro*, que simulan las condiciones de la digestión gastrointestinal humana. Por otra parte, se evaluó el tipo de proteínas a las que estaba unido el Zn mediante el empleo de la técnica SEC-ICP-MS. Los

resultados obtenidos de la aplicación de la digestión gastrointestinal *in vitro* mostraron porcentajes de biodisponibilidad de cinc muy bajos, para todas las fórmulas infantiles estudiadas. Sin embargo, estos resultados fueron contradictorios con los datos proporcionados por los estudios de especiación. Los análisis mediante SEC-ICP-MS evidenciaron que el cinc se encontraba unido, mayoritariamente, a proteínas de bajo peso molecular (10 kDa). Este tamaño es lo suficientemente pequeño para que las biomoléculas a las que se encuentra asociado el Zn puedan ser adsorbidas de forma efectiva por el intestino. Por tanto, en este trabajo se pone de manifiesto la utilidad de los estudios de especiación para complementar y validar los resultados derivados de los métodos *in vitro* empleados para el estudio de la biodisponibilidad de elementos traza en alimentos.

Por otro lado, el cinc en forma de nanopartículas de óxido de cinc (ZnONPs) se ha propuesto recientemente para su uso en otros ámbitos de la industria alimentaria, en concreto para el desarrollo de envases activos. La incorporación de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos a materiales de uso alimentario mejora las propiedades antimicrobianas, mecánicas y físicas del material resultante. En este sentido, las ZnONPs han centrado la atención de numerosos estudios principalmente por su capacidad antimicrobiana y bloqueante de la radiación ultravioleta, y por su menor toxicidad frente a otras nanopartículas con esas mismas características, como son las AgNPs. Sin embargo, el uso de nanomateriales en envases alimentarios también puede conllevar una serie de riesgos, sobre todo como consecuencia de la posible migración de las nanopartículas desde el envase al alimento. Por este motivo, resulta esencial realizar estudios sobre la posible migración de las nanopartículas una vez desarrollado el material con el fin de no comprometer la seguridad del consumidor. Asimismo, también es importante establecer los posibles cambios que los nanomateriales pueden sufrir una vez que entran en contacto con el alimento, ya que la matriz alimentaria puede producir alteraciones en las propiedades de las nanopartículas, lo que va a condicionar su posterior efecto. Sin embargo, determinar el efecto de la matriz alimentaria en la estabilidad de los nanomateriales no es una tarea fácil.

La dificultad que conlleva la identificación, caracterización y cuantificación de los nanomateriales en matrices complejas, como son los alimentos, hace necesario el empleo de diferentes técnicas analíticas complementarias. En este sentido, la EFSA incluye entre sus directrices un listado de las técnicas y metodologías más adecuadas para la evaluación de los riesgos asociados al empleo de la nanociencia y la nanotecnología en el sector alimentario. Además, en esta guía se recomienda el empleo de más de una técnica de caracterización para realizar una evaluación fiable e inequívoca de los riesgos. De entre las

técnicas citadas, la técnica ICP-MS en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS) junto con la microscopía electrónica, aparecen como las más adecuadas. Otro de los aspectos que la EFSA considera necesario abordar para una correcta evaluación de los riesgos, es la realización de ensayos que permitan establecer el comportamiento de dichos materiales en el tracto gastrointestinal.

Teniendo en cuenta la problemática expuesta, el segundo trabajo que se presenta en este capítulo (Artículo 4) y que lleva por título **“Using single-particle ICP-MS for unravelling the effect of type of food on the physicochemical properties and gastrointestinal stability of ZnONPs released from packaging materials”** (*Anal. Chim. Acta.*, 2020, 1100, 12-21), tiene como objetivo evaluar las transformaciones de las ZnONPs desde que son incorporadas a los envases alimentarios hasta que llegan al consumidor como consecuencia de su posible migración al alimento. Para simular las condiciones de migración, las ZnONPs se incorporaron a dos materiales plásticos (PET y LDPE) ampliamente utilizados en el envase alimentario. Posteriormente, los materiales resultantes fueron puestos en contacto con dos matrices alimentarias diferentes, zumo de naranja y pechuga de pollo, a distintos tiempos de exposición. La combinación de TEM junto con la técnica SP-ICP-MS permitió caracterizar las nanopartículas migradas a los alimentos en término de morfología, tamaño, distribución de tamaño y concentración de la fracción disuelta y particulada. Desafortunadamente, la elevada tendencia de las ZnONPs a disolverse a Zn iónico en presencia de zumo de naranja hizo imposible la caracterización de las nanopartículas en esta matriz mediante SP-ICP-MS. Finalmente, el comportamiento de dichas partículas en el tracto gastrointestinal se evaluó mediante procesos de digestión gastrointestinal *in vitro*. El análisis de los extractos obtenidos mediante TEM y SP-ICP-MS puso de manifiesto que estas partículas son capaces de alcanzar las paredes del intestino en forma de agregados, de pequeñas partículas, y/o en forma de iones disueltos, todo ello en función de la naturaleza de la matriz alimentaria a la que hayan migrado.

La combinación de las técnicas como SP-ICP-MS y TEM han permitido demostrar la fuerte influencia que ejerce tanto el tipo de matriz alimentaria como las condiciones fisiológicas que se dan durante los procesos de digestión gastrointestinal sobre las características físico-químicas de las nanopartículas. Por otra parte, a pesar de las ventajas de la técnica de SP-ICP-MS para la caracterización de las nanopartículas, su aplicación a aquellas que se disuelven fácilmente, como es el caso de las de ZnONPs, no proporciona datos cuantitativos y fiables. De ahí la necesidad de emplear más de una técnica analítica para establecer el comportamiento de las nanopartículas con tendencia a disolverse en matrices complejas.

ARTÍCULO 3

Evaluación de la biodisponibilidad de cinc en fórmulas infantiles mediante métodos *in vitro* (solubilidad y dializabilidad) y cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) acoplada a ICP-MS.

Availability of zinc from infant formula by *in vitro* methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Madrid, Y.

J. Dairy Sci., 2016, 99, 9405-9414.



Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“14^{as} JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL (JAIS)”. Barcelona, España, Octubre 2014.
Tipo de comunicación: póster.



Availability of zinc from infant formula by in vitro methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry

Beatriz Gomez Gomez, M. Teresa Perez-Corona, and Yolanda Madrid¹

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ABSTRACT

Zinc bioaccessibility from infant formula was estimated by in vitro methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography (SEC) coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Infant formula samples were first characterized in terms of Zn bound to lipids and proteins and Zn distribution in the aqueous soluble protein fraction. We found that Zn is not incorporated into the lipid fraction of the samples, being mainly associated with the protein fraction (around 100%). Fractionation of Zn-containing proteins in the soluble protein fraction was achieved by SEC-ICP-MS after performing protein extraction with a solution of 100 mM (pH 6.8) Tris-HCl. The percentages of zinc in the soluble protein fraction in the soy-based and lactose-free infant formula were very low, around 7 and 24%, respectively, whereas the content of Zn in the soluble protein fraction of milk-based formula was around 90%. By SEC-ICP-MS, we found that Zn is associated with low-molecular weight compounds (around 10 kDa) in all the infant formulas tested. The percentages of Zn estimated in the in vitro gastrointestinal digests of the infant formula ranged from 30 to 70% and from 1 to 10% for solubility and dialyzability assays, respectively. The dialyzability test resulted in lower than expected scores, as SEC-ICP-MS analysis of the gastrointestinal extracts revealed that Zn is bound to biomolecules with a molecular weight ranging from 1 to 7 kDa, which suggests that dialysis data should be interpreted with caution. Speciation studies are a valuable tool for establishing availability of nutrients and for validating data from dialyzable in vitro methods.

Key words: zinc, infant formula, in vitro bioaccessibility, speciation

INTRODUCTION

Zinc is an essential nutrient (Harmaza and Slobozhanina, 2014) with a recommended daily intake dependent on age and sex, ranging from 2.6 to 9.3 mg/d in children, from 6.8 to 14.5 mg/d in adolescents, and from 8.0 to 14.0 mg/d in adults (EFSA, 2014). Although zinc is one of the most abundant essential elements in the human body, its deficiency is very common, particularly in areas where cereal proteins are primary components of the local diets. Cereal proteins contain high amount of an organic phosphate compound, phytate, which complexes zinc and makes it unavailable for absorption. The groups more vulnerable for Zn deficiency are pregnant and lactating women and young children (WHO, 2009). The pathological signs of zinc deficiency in young children are growth failure, alteration of cognitive functions, increases of the incidence rate of infectious diseases, and impaired parturition (dystocia; Prasad, 1998).

The first 2 yr of a child's life are particularly important, as optimal nutrition during this period lowers morbidity and mortality, reduces the risk of chronic disease, and fosters better development overall. Although breast milk is the best nutritional choice for infants, when breastfeeding is not possible infant formula is a healthy alternative. Infant formula has to fulfil the nutritional requirements of infants for optimum development (EFSA, 2009). These products are based on cow milk or on edible constituents of plant origin that have been proven to be suitable for infant feeding; for instance, soy formula has become popular as an alternative formula in infants who are allergic to cow milk. The main goal of the composition of infant formula is to make it similar to that of human milk. However, infant formula and human milk present differences in the protein content, supply of EAA, and content of essential trace elements (Lönnerdal, 2014). Moreover, the composition of breast milk changes dynamically during the period of lactation. In contrast, infant formulas have an established composition that only varies depending on the type of infant formula (Brätter et al., 1998).

Received May 5, 2016.

Accepted August 23, 2016.

¹Corresponding author: ymadrid@quim.ucm.es

It is well known that only a certain amount of all nutrients in food are used effectively by the organism. For this reason, a correct evaluation of nutrients effect implies not only the determination of their total concentration, but also their bioavailability and, when possible, the chemical form present in the soluble fractions. Bioavailability is defined as the amount of an ingested nutrient that is absorbed and available for physiological functions. This parameter is dependent on digestion, the food matrix, absorption by intestinal cells, and transport to body cells (Etcheverry et al., 2012). Bioaccessibility is the amount of an ingested nutrient that is potentially available for absorption and is dependent only on digestion and release from the food matrix (Fernández-García et al., 2009). The bioavailability and bioaccessibility can be assessed by *in vivo* or *in vitro* techniques. *In vivo* methodology is the most appropriate, but it is time-consuming, costly, and difficult to perform (Perales et al., 2006). *In vitro* methods are a good alternative for evaluating bioaccessibility or bioavailability. Four principal *in vitro* methods exist: solubility, dialyzability, and gastrointestinal models (e.g., TIM, TNO intestinal model) for bioaccessibility, and Caco-2 models for bioavailability (Etcheverry et al., 2012). For solubility assays, the food studied is generally subjected to a simulation of gastrointestinal digestion including 3 steps: mouth digestion, gastric digestion, and intestinal digestion (Alzate et al., 2010). The *in vitro* dialyzability methods involve a 2-step digestion process simulating the gastric and intestinal

phase and dialysis through a semipermeable membrane with a selected molecular weight cutoff (Moreda-Piñeiro et al., 2012).

Based on these dietary considerations, the aim of our study was first to characterize different types of infant formula (4 of them based on cow milk and 1 on soy protein) in terms of Zn bound to lipids and proteins and Zn distribution in the aqueous soluble protein fraction, and second to investigate the solubility and dialyzability of Zn from selected infant formulas. Moreover, Zn species in the resulting extracts were determined by size-exclusion chromatography (SEC) on line coupled to a UV-visible (UV-VIS) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) detectors.

MATERIALS AND METHODS

Instrumentation

A flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS; Perkin Elmer 1100, Waltham, MA) was used for Zn analysis. A Zn hollow cathode lamp was run under operational conditions suggested by the manufacturer (Perkin Elmer, Norwalk, CT), shown in Table 1. All measurements were performed with an air-acetylene flame. The experimental conditions are compiled in Table 1.

Before total zinc determination, samples were microwave digested in double-walled advanced composite vessels using a 1,600-W microwave sample preparation

Table 1. Operating instrumental conditions

Instrument and characteristic	Conditions
Inductively coupled plasma-mass spectrometry parameters	
Radiofrequency power (W)	1,250
Plasma gas flow rate (mL/min)	15.0
Ar auxiliary flow rate (mL/min)	1.26
Carrier gas flow rate (mL/min)	1.1
Nebulizer	Meinhard (glass concentric nebulizer)
Spray chamber	Scott (double-pass or reversed-flow type)
Acquisition mode	Continuous
Isotopes monitored	⁶⁶ Zn
Size-exclusion chromatography chromatographic parameters	
Columns	Superdex 200 ¹ (10–600 kDa) Superdex 75 (3–70 kDa) Superdex peptide (0.1–7 kDa)
Mobile phases	Tris-HCl 50 mM, KCl 0.05 mM (pH 6.8)
Mode	Isocratic
Flow rate (mL/min)	0.7
Injection volume (μL)	100
Flame atomic absorption spectrophotometer parameters	
Wavelength (nm)	213.9
Band pass (nm)	0.2
Lamp current (%)	75
Signal	Continuous
Fuel flow rate (acetylene/air; mL/min)	2.5/4.0
Flame type	Air-acetylene

¹GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.

system microwave oven (CEM, Matthews, NC) equipped with temperature and pressure feedback controllers and 12 high-pressure vessels with 100 mL of inner volume. An incubator Heraeus D-6450 (Hanau, Germany) and an Eppendorf 5804 F34-6-38 ultracentrifuge were used in vitro simulation procedures.

The HPLC-ICP-MS measurements were carried out using a PU-2089 LC pump (Jasco, Tokyo, Japan) fitted with a 6-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohnert Park, CA) with a 100- μ L injection loop for the chromatographic separations. Chromatographic separations were performed using different size exclusion Superdex (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) columns ranged from 600 to 0.1 kDa. The outlet of the column was connected directly to the conical nebulizer of the ICP-MS with Peek tubing (Shimadzu, Tokyo, Japan). The SEC columns were also coupled to a Jasco LC-NET II/ADC UV-VIS spectrophotometer equipped with a photodiode array detector MD-2018 to monitor the UV absorption (280 nm) of proteins. The operating parameters are compiled in Table 1.

Reagents and Standards

Five types of commercial infant formula (NSL, NH1, BPF, and NC3, based on cow milk; and NS, based on soy protein) were used in our study. Characteristics of the selected infant formulas are detailed in Table 2. Chemicals and reagents were of analytical grade and solutions were prepared with deionized water (18 M Ω -cm) from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, Bedford, MA).

The 1,000 mg/L zinc standard solution was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Working solutions were prepared daily by appropriately diluting the concentrate standard in Milli-Q water. Stock solutions were stored at 4°C. To avoid metal contamination, all glassware and plastic ware were kept in 10% (vol/vol)

nitric acid and then rinsed several times with ultrapure water before use. Both HNO₃ (64%) and H₂O₂ (35%) from Panreac (Castellar de Valles, Spain) were used to digest the samples. Infant formula defatting was performed using cyclohexane (Scharlab, Barcelona, Spain).

For gastrointestinal simulated digestion, α -amylase (Merck, Kenilworth, NJ) was used in the mouth digestion step, 6% porcine pepsin (Sigma-Aldrich) and 0.15 M NaCl at pH 1.8 adjusted with 2 M HCl (35%, Merck) were used in the gastric digestion step, and 1.5% porcine pancreatin (Merck), 0.15% of biliary salts (Sigma), and 0.15 M NaCl were used in the intestinal digestion step. Digestive enzymes such as α -amylase from *Bacillus subtilis* powder, pepsin from porcine gastric mucosa, bile salts, pancreatin from porcine pancreas, and sodium hydrogen carbonate were purchased from Sigma-Aldrich. Piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) disodium and cellulose dialysis tubing (molecular weight cutoff \approx 12 kDa, 30 cm in length and 21 mm in diameter) were also purchased from Sigma-Aldrich.

The following peptides and proteins of different molecular weights were used for calibrating molecular weights for SEC: albumin from bovine serum (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), ribonuclease A from bovine pancreas (13.7 kDa), cytochrome C (12 kDa), aprotinin (7 kDa), and glycine (75 Da; all from Sigma-Aldrich). Potassium chloride (Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Germany) and Tris-HCl (Bio-Rad, Hercules, CA) were used for preparing the mobile phase.

Determination of Zn in Infant Formula by FAAS

Around 1.0 g of samples were accurately weighed and then digested with 3 mL of a mixture of nitric acid (65%) and hydrogen peroxide (35%; 3:1) in an analytical microwave oven. The solutions were then transferred to volumetric flasks and appropriately diluted to a final

Table 2. Total, soluble, and dialyzate zinc contents (mean \pm SD; n = 10)

Sample	Age given	Description	Zn (mg/100 g of milk)	Solubility ¹ (%)	Dialysis ¹ (%)
NSL ²	From 1 d	Lactose-free formula	4.6 \pm 0.4	68 \pm 4	7.0 \pm 0.1
NH1 ²	From 1 d	Extensively hydrolyzed proteins formula with nucleotides, prebiotics, and docosahexaenoic acid.	4.6 \pm 0.4	62 \pm 5	11 \pm 3
NS ³	From 1 d	Soy-based formula	4.6 \pm 0.2	25 \pm 6	7.0 \pm 0.1
BPF ²	From 6 mo	Hydrolyzed proteins formula for infants with allergies or intolerant to milk proteins	4.0 \pm 0.4	63 \pm 9	6 \pm 2
NC3 ²	From 1 yr	Standard milk-based formula enriched with calcium, iron, and vitamins	2.7 \pm 0.7	64 \pm 9	1.0 \pm 0.1

¹Solubility or dialysis = 100 \times soluble or dialyzate content/total zinc content.

²Cow milk-based infant formulas.

³Formula derived from soy protein-based infant formula.

volume of 10 mL with Milli-Q water. These solutions were used in the Zn determination by FAAS under the experimental conditions listed in Table 1. By using this protocol, the concentration of Zn in the solution underwent the analysis was suitable to the method sensitivity (0.059 mg/L). A similar procedure was used for determining Zn in gastrointestinal-simulated extracts, in vitro dialyzable extracts, and the protein-soluble fraction.

Infant Formula Defatting

This was carried out according to the defatting procedure of Palomo et al. (2014). Approximately 2.5 g of sample were defatted using 6 mL of cyclohexane followed by stirring during 10 min and subsequent centrifugation at $7,728 \times g$ for 10 min at 20°C. The supernatant was discharged and the precipitate was subjected twice to the same procedure by adding fresh cyclohexane. Defatted samples were dried in an oven at 37°C.

Protein Extraction Procedure and Quantification Using the Bradford Method

Protein precipitation was performed by overnight incubation of 0.5 g of infant formula with 9 mL of acetone 80% (vol/vol), cooling at -20°C, and subsequent centrifugation at $14,610 \times g$ for 10 min at 4°C. The resulting precipitate was collected and washed with 3 mL of pure acetone at -20°C; the process was repeated twice. The protein pellet obtained was subjected to acid digestion and subsequently measured by FAAS to determine Zn concentration.

The soluble protein fraction was obtained by treating 50 mg of the protein pellet with 2.5 mL of a solution containing 100 mM (pH 6.8) Tris-HCl. The mixture was sonicated for 2 min at 40% power using an ultrasound probe. The supernatant was collected after centrifugation at $12,074 \times g$ for 25 min at 25°C. The obtained soluble protein fraction was divided into 2 portions for total Zn determination and protein analysis, respectively. Protein in the soluble fractions was quantified using the Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) in combination with UV-VIS measurements at 595 nm. Bovine serum albumin was used as the standard in a concentration range of 0 to 20 mg/L.

In Vitro Solubility Assay and In Vitro Dialyzable Process

The in vitro solubility assay was carried out by simulating the digestion conditions that occur in the mouth, stomach, and intestine, and by following the ex-

perimental procedure described by Alzate et al. (2010) and Moreda-Piñeiro et al. (2012). Briefly, about 2.5 g of infant formula was placed into 12-mL polystyrene tubes containing 1 mL of 1.7 mg/mL α -amylase solution. The mixture was incubated for 15 min at 37°C. Subsequently, 7.5 mL of freshly prepared gastric juice that consisted of 12 mg/mL pepsin in 0.15 M NaCl at pH 1.8 adjusted with 6 M HCl was added. The mixture was kept in a thermostatic bath at 37°C for 4 h. After gastric digestion, 5 mL of pancreatin-bile solution (3 mg/mL of pancreatin and 0.3 mg/mL of bile salts in 0.15 M NaCl and saturated NaHCO₃ solution) was added to simulate the intestinal digestion. The mixture was then left at 37°C for 4 h in a thermostatic bath, shaking periodically every 10 min. Once digestion was finished, samples were centrifuged at $4,347 \times g$ for 30 min at 4°C. The supernatant was filtered through a 0.22- μ m nylon filter and kept at 4°C until analysis. This fraction, called the soluble fraction, was used further for determining both the concentration of Zn and the presence of Zn-containing biomolecules. The procedure was performed in triplicate. Blanks of gastrointestinal digestion were prepared in parallel.

The in vitro dialyzable procedure was performed by repeating the in vitro digestion assay with the exception of placing a dialysis membrane (≈ 12 kDa) filled with 0.15 N piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) disodium solution inside the polystyrene tubes before adding the intestinal solution. After 120 min of contact time, the membrane was removed and its outer surface was rinsed with deionized water. The content of Zn in the dialyzed fraction was measured by FAAS after digesting the samples in a microwave oven with H₂O₂ or HNO₃. Blanks were prepared in parallel.

Determination of Zn-Containing Biomolecules by SEC with UV and ICP-MS Detectors

Zinc-containing biomolecules were detected in the solubility extracts, dialyzable extracts, and in the protein-soluble fraction by SEC-UV-ICP-MS using 3 SEC columns (listed in Table 1) with different molecular weights. Optimal separation conditions are summarized in Table 1. The following peptides and proteins of molecular weights from 0.75 to 67 kDa were used for the determination of molecular weights: 8 mg/mL albumin (67 kDa), 5 mg/mL ribonuclease A (13.7 kDa), 1.5 mg/mL cytochrome C (13.6 kDa), 2 mg/mL aprotinin (1.4 kDa), 2.5 mg/mL ovalbumin (4.3 kDa), and 1 mg/mL glycine (75 Da). A solution consisting of 50 mM Tris-HCl and 0.05 mM KCl at pH 6.8 was used as the mobile phase. The mass calibration curve for the SEC was determined by UV (280 nm) by plotting log (molecular weight) versus the retention time. The column was

regularly washed according to the recommendations of the manufacturer to remove adsorbed material.

around 100% of Zn present in all the infant formulas tested was bound to the protein fraction.

RESULTS AND DISCUSSION

Total Zn Content in Infant Formula

Zinc concentration in infant formula was determined by FAAS after microwave acid digestion of the samples following the procedure described in the Materials and Method section. Infant formula of different brands and characteristics (4 based on cow milk and 1 on soy protein) were acquired in local supermarkets. As noted previously, the main source of Zn in infants (aged 0–12 mo) is human milk or infant formulas. The addition of Zn compounds during manufacture is a common practice when preparing infant formula, with the aim of reaching the levels of recommended daily intake. The Zn compounds allowed by European legislation (European Commission, 1991) are zinc acetate, zinc chloride, zinc sulfate, zinc gluconate, and zinc oxide (Guillem et al., 2000). According to the information given by the manufacturers, all the infant formula tested in our study includes Zn as zinc sulfate; however, no information about the level of Zn enrichment is provided. As shown in Table 2, the concentrations of Zn in the infant formulas tested were quite similar except for infant formula developed for infants at least 1 yr old. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD; $n = 3$ replicates). The zinc contents found were in agreement with the contents reported on the label by the manufacturer.

The analytical methodology used was validated by analyzing a reference material certified for Zn (skim milk powder certified reference material; BCR-063R). No significant differences were observed between the certified value (49.0 ± 0.4 mg/kg) and the experimental value (50.0 ± 0.8 mg/kg) of Zn at the 95% of confidence level.

Lipid Fraction-Bound Zn

Determination of the Zn content present in the lipid fraction of the infant formula was carried out by FAAS analysis of the solid residue obtained after sample defatting. The percentage of Zn found was lower than 1%, indicating that Zn was not incorporated into the lipid fraction of the infant formula.

Protein-Bound Zn

The determination of Zn in the protein pellet by FAAS after microwave acid digestion revealed that

Fractionation of Proteins in Infant Formula by SEC-UV-VIS and SEC-ICP-MS

Zinc determination in the Tris-soluble protein fraction by FAAS showed that the amount of Zn was of around 95% of the total Zn concentration. In contrast, the percentages of zinc found in the soluble protein fraction in the soy-based (NS) and lactose-free (NLS) infant formula were very low, around the 7 and 24%, respectively.

Subsequently, the soluble protein extracts from infant formula were analyzed by SEC-UV-VIS and SEC-ICP-MS. To improve the resolution of SEC when fractionating biomolecules, 3 SEC columns of different molecular weights were applied: Superdex 200 (10–600 kDa), Superdex 75 (3–70 kDa), and Superdex Peptide (0.1–7 kDa). The UV-VIS chromatographic profile from Superdex 200 column is shown in Figure 1a. Most of the biomolecules extracted from the infant formula were found in the low-molecular-weight region (at a retention time of 30 min, which corresponds to a molecular weight of around 10 kDa). The remaining proteins were detected at a retention time of 10 min, representing compounds with a higher molecular weight (around 400 kDa). The soy-based infant formula (NS) presented a different UV profile, with the proteins mainly distributed in the low-molecular-weight region (around 20–10 kDa).

The chromatogram obtained with ICP-MS is shown in Figure 1b. Comparing the UV and Zn (^{66}Zn) profiles, Zn is only bound to biomolecules of low molecular weight (around 10 kDa). This behavior was observed in both soy- and milk-based infant formulas.

However, the low resolution of the Superdex 200 column limits the information on Zn incorporation in biomolecules. Because Zn in the soluble protein fraction is mostly bound to low-molecular-weight compounds (around 10 kDa), a Superdex 75 column with a separation range between 3 and 70 kDa was subsequently used. The ICP-MS profile (Figure 1c) shows that Zn was associated with biomolecules in the low-molecular-mass region around 10 kDa. The results obtained by using the 2 columns, Superdex 200 and Superdex 75, may indicate that zinc is bounded to biomolecules with an estimated molecular mass around 10 kDa. However, Zn-containing peaks still appeared in the lower fractionation range given by the manufacturer, which could lead to erroneous results and conclusions. Therefore, a different column, Superdex Peptide (0.1–7 kDa), was further applied for obtaining better Zn fractionation in

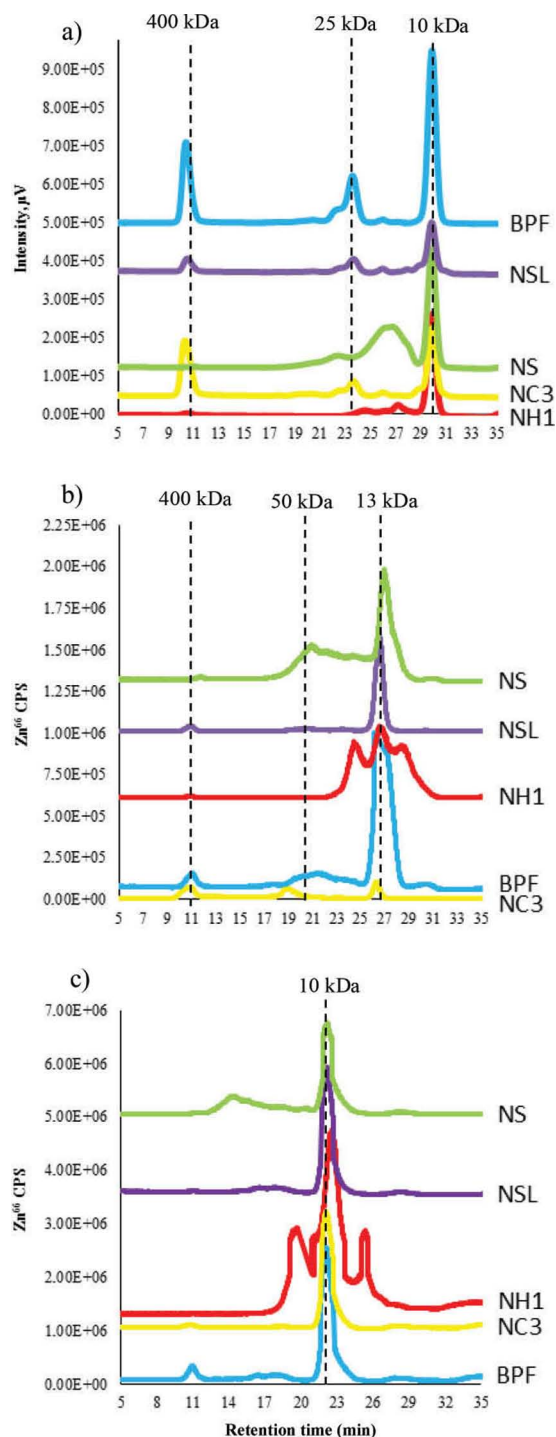


Figure 1. (a) Chromatograms on Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) obtained by size-exclusion chromatography (SEC)-UV-visible spectrometry corresponding to the Tris-HCl soluble protein fraction from infant formulas (NC3, BPF, NH1, NSL, and NS). (b) Chromatograms on Superdex 200 obtained by SEC-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) at 64 m/z corresponding to the Tris-HCl soluble protein fraction from infant formulas (NC3, BPF, NH1, NSL, and NS). CPS = counts per second. (c) Chromatograms on Superdex 75 at 64 m/z corresponding to the Tris-HCl soluble protein fraction from infant formulas (NC3, BPF, NH1, NSL, and NS). Color version available online.

the soluble protein fraction. Figure 2a shows the ICP-MS profile of the protein soluble fraction. The chromatographic profiles obtained are highly dependent on the type of infant formula tested, with estimated molecular weights ranged from 0.2 to 7 kDa. Given the small size of the biomolecules, the presence of Zn-free form was evaluated by passing a 2 mg/L Zn^{2+} solution through the column and further analysis by ICP-MS. Results (not shown) indicated that Zn^{2+} standard appeared at a retention time of 35 min, representing a retention time value higher than those found for the Zn-containing peaks in the infant formula tested; this confirmed that Zn is mainly associated with biomolecules of low molecular weight rather than Zn-free form. The results obtained from our fractionation study suggest that Zn is mainly present in the cow milk-based infant formula in the soluble protein fraction, whereas only 7 and 24% of total Zn was detected in the soluble protein fraction of the soy-based and cow milk lactose-free infant formulas. The low percentage of Zn in the soluble protein fraction found in these 2 types of infant formula could have influence in their bioavailability and, therefore, nutritional value in relation to Zn.

Availability of Zn in Infant Formulas by In Vitro Methods

Results from in vitro simulated gastrointestinal digestion of infant formula are shown in Table 3. Soluble Zn content after applying a simulated gastric and gastrointestinal digestion in infant formula ranged from 30 to 90% and from 30 to 70%, respectively. The Zn solubility values obtained are higher than those in the literature (Singh et al., 2016) for raw cow milk (the starting material for preparing cow-milk infant formula), with values ranged from 15 to 20%. This suggests that both Zn supplementation and the treatment used to improve digestibility favor Zn solubility.

No significant ($P > 0.05$) differences were observed between the percentages of Zn found in gastric and gastrointestinal extracts in all the infant formula tested, except for a follow-up formula (NC3) composed mainly of standard cow milk. The remaining infant formula used in our study was formulated for infants from 1 d old and, therefore, were all treated to include hydrolyzed proteins to improve digestibility. One-day-old infants have a gastrointestinal tract that does not produce the same digestive enzymes as a child or adult. Babies can digest breast milk more easily than infant formula because breast milk contains enzymes (amylase and lipase) that aid digestion. The treatment used to improve digestibility might explain why we found no effect of digestive enzymes in releasing Zn. In general, no significant ($P > 0.05$) differences were observed be-

ZINC AVAILABILITY FROM INFANT FORMULA

Table 3. Zinc percentages in gastric and gastrointestinal extracts (mean \pm SD; n = 10)

Sample	Gastric digestion ¹ (%)	Gastrointestinal digestion (solubility) ¹ (%)
NH1 ²	73 \pm 2	62 \pm 5
NC3 ²	29 \pm 4	64 \pm 9
NSL ² (lactose-free infant formula)	71 \pm 4	68 \pm 4
NS ³ (soy-based infant formula)	35 \pm 6	25 \pm 6
BPF ²	86 \pm 6	63 \pm 9

¹Gastric digestion or solubility = 100 \times gastric or soluble content/total zinc content.

²Cow milk-based infant formulas.

³Formula derived from soy protein-based infant formula.

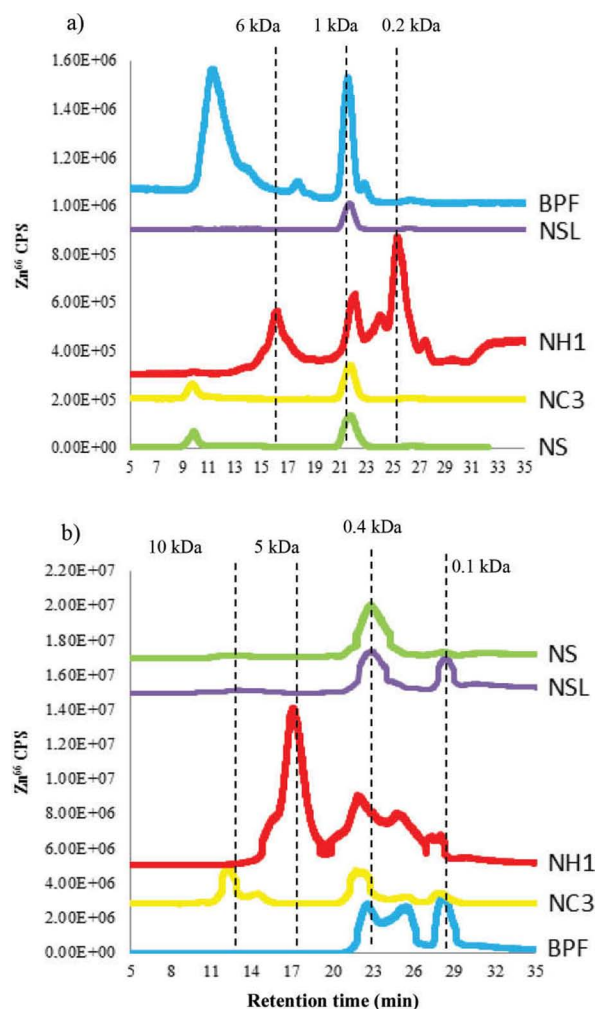


Figure 2. (a) Chromatograms on Superdex (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) Peptide obtained by size-exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (SEC-ICP-MS) at 64 m/z corresponding to the Tris-HCl soluble protein fraction from infant formulas (NC3, BPF, NH1, NSL, and NS). CPS = counts per second. (b) Chromatograms on Superdex Peptide obtained by SEC-ICP-MS at 64 m/z corresponding to gastrointestinal extracts from infant formulas (NC3, BPF, NH1, NSL, and NS). Color version available online.

tween the percentages of Zn found in gastrointestinal extracts from all the formulas derived from cow milk. However, a low percentage of Zn (30%) was found in the gastrointestinal extract from soy-based infant formula. This result is in agreement with the low percentage of Zn detected in the low-soluble protein fraction of the soy-based infant formula (7%). It is well known that Zn bioaccessibility is highly dependent on the food matrix. Isolated soy protein-based formulas currently on the market are all free of cow milk protein and lactose and have been employed as a milk substitute for infants unable to tolerate a cow milk protein-based formula. Until 1980, mineral absorption from soy formulas was erratic because of the poor stability of the suspensions and the presence of excessive soy phytates. Phytates are organic compounds derived from phytic acid or inositol polyphosphate ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) that are widely distributed in all seeds and, possibly, all cells of plants. A high content of phytate in food has been considered as a limiting factor for the mineral bioaccessibility and bioavailability. Soy protein isolate formulas still contain 1.5% phytates able to bind zinc, therefore decreasing its bioaccessibility. As with other essential elements, the bioavailability of zinc from foods is dependent on the presence of dietary components in the intestinal lumen; for example, calcium and iron influence Zn bioaccessibility according to a number of studies that included integrated approaches based on the interaction of these 3 minerals (Krebs, 2000; Perales et al., 2006; Olivares et al., 2012). The presence of phytate and nucleic acids (phosphorus-containing compounds) decreases zinc absorption, and calcium might have a potential inhibitory effect on zinc that is only evident when phytate is present in the food (Bosscher et al., 2002; Liang et al., 2010). The amount and type of protein in the diet also affects zinc absorption. In, general, animal proteins present in foods, such as beef, eggs, and cheese, have been shown to have a positive effect on zinc absorption, with the exception of casein (Drago and Valencia, 2004). It has been also reported that the use of hydrolysates of milk

proteins benefits Zn absorption. For instance, Wang et al. (2011) demonstrated the highest Zn-release activity of yak casein hydrolysate (prepared with alcalase and trypsin) compared with the intact yak casein, suggesting the use of yak casein hydrolysate as a vehicle for delivering Zn. However, the Zn compound selected for supplementation affects Zn bioaccessibility in infant formula. In agreement with this, Guillem et al. (2000) fortified infant formula with different Zn compounds. Data obtained from in vitro dialyzability assays revealed that Zn availability in milk-based formulas decreases in the order of oxide > gluconate = chloride = lactate = citrate > acetate, and from soy-based infant formulas in the order of gluconate > oxide > lactate = chloride = acetate > sulfate > citrate.

An additional factor that could alter bioaccessibility is the fat content. In the current study, in vitro-simulated gastrointestinal digestion of infant formula was performed in defatted and nondefatted samples. No significant differences ($P > 0.05$) were observed between the values provided for both type of samples, which is in agreement with the low percentage of Zn bound to the lipid fraction.

The gastrointestinal extracts from each infant formula were further analyzed by SEC-ICP-MS using the Superdex Peptide (0.1–7 kDa) column. The ^{66}Zn chromatographic profiles in Figure 2 suggest that Zn-containing peaks are associated with the low-molecular-weight region <10 kDa, which could imply that Zn-bound compounds in the gastrointestinal extracts were small enough to be absorbed by the intestine. To determine the Zn concentration in the 0.1- to 7-kDa fraction, the Zn-containing peaks were collected and subsequently analyzed by ICP-MS following the experimental conditions given in Table 1. Around 60 and 30% of total Zn content was found in the 0.1- to 7-kDa fraction of cow milk- and soy protein-based infant formulas, respectively. These results are in agreement with those obtained when determining Zn in the soluble fraction, suggesting the presence of Zn in the soluble fraction of the infant formula as Zn bound to molecules of low molecular weight and, therefore, small enough to be used in physiological functions.

To verify, an in vitro dialyzability technique was applied by using the procedure described in the Material and Methods section. The in vitro dialyzability assay is considered the most appropriate method to study Zn bioaccessibility; thus far, it is the only method that has been validated against human studies (Hotz, 2005). As shown in Table 2, the percentage of Zn in the dialyzed fractions were very low (11% or less) and similar to those reported by other authors for the same kinds of samples (Guillem et al., 2000; Perales et al., 2006). The highest Zn dialysis percentage was found in a cow milk-

based infant formula composed of hydrolyzed proteins and prebiotics (NH1 sample). The addition of prebiotics (galacto-oligosaccharides, fructo-oligosaccharide, polydextrose, and mixtures of these) in infant formula has benefits, as prebiotics are known to alter the gastrointestinal microbiota resembling that of breastfed infants. Infants supplemented with this type of formula have a lower stool pH, a better stool consistency and frequency, and a higher concentration of bifidobacteria in their intestine compared with infants on a non-supplemented standard formula (Vandenplas et al., 2015). The combined presence of prebiotics and hydrolyzed milk proteins may have influence on Zn availability, thus leading to the highest dialysis percentage value compared with the other infant formulas tested. The lowest Zn dialysis percentage corresponded to a follow-up cow milk-based infant formula (NC3 sample); the presence of nonhydrolyzed proteins in samples of this kind could decrease their dialyzability.

According to the data obtained by SEC-ICP-MS analysis of the gastrointestinal extracts (Figure 2b), the soluble Zn found in the supernatant after applying the gastrointestinal in vitro digestion method is available for absorption. However, the concentration of Zn in dialysates was lower than expected according to the molecular weight of the Zn compounds found in the gastrointestinal extracts with smaller size (from 0.1 to 7 kDa) than the pore size of the dialysis membrane used (molecular weight cutoff = 10–12 kDa). Therefore, although all soluble Zn seems to be available for absorption, the amount of Zn absorbed according to the in vitro dialyzability technique is much lower. This means that some of the soluble Zn does not dialyze in the in vitro assay conditions applied. Although in vitro dialyzability technique is recommended as the best in vitro method for estimating the absorption of Zn in the small intestine, the procedure is dependent on several factors that may influence the results, such as a rigorous control of pH and characteristics and performance of the selected cutoff of the dialysis membrane. Commercial dialysis membranes have broad pore size distributions and are over 1,000 times thicker than the molecules they are designed to separate, leading to poor size cutoff properties, filtrate loss within the membranes, and low transport rates; these factors could lead to differences when correlating in vivo and in vitro data. In vitro solubility or dialyzability methods correlate in most cases with human absorption studies in ranking iron and zinc availability from different meals; however, the effect of the food matrix (milk and tea) as well as certain proteins and organic acids can lead to unpredicted results. For instance, it has been observed that dialyzability methods exclude iron bound to large molecules, which in some cases is available,

and includes iron bound to small molecules, which is not always available. Roig et al. (1999) found a better agreement between the *in vivo* percentages of calcium absorption and *in vitro* soluble calcium percentages than between the percentage of calcium that is able to pass through the intestinal walls when performing *in vivo* studies and the dialyzed calcium percentages. Despite these limitations, *in vitro* experiments based on solubility or dialyzability are very valuable tools to help understand factors that may affect subsequent mineral absorption. The current study revealed that *in vitro* dialysis results must be interpreted with some caution. Dialysis values should be validated by applying either *in vitro* assays with Caco-2 cells or by performing speciation studies. The application of speciation analysis (SEC-ICP-MS) is a powerful and essential tool for establishing the performance of *in vitro* bioaccessibility studies, for obtaining a better agreement between *in vivo* and *in vitro* methods, and for gaining a deeper insight into the mechanisms affecting the absorption of essential elements such as Zn.

CONCLUSIONS

More studies are needed to validate the *in vitro* methods for measuring zinc bioavailability. Studies of zinc availability in infant formula are of vital importance due to the role of zinc in the normal growth and development of infants and children. In this study, the percentages of Zn solubility obtained by applying the *in vitro* digestion method to infant formula ranged from 60 to 70% when formulations were manufactured from cow milk; however, values as low as 23% were obtained when soy-based infant formula were evaluated. Analysis by SEC-ICP-MS of gastrointestinal extracts revealed that Zn is associated with the low-molecular-weight region (0.1–7 kDa), which are small enough to be absorbed by the intestine and, therefore, to be use in physiological functions. However, after applying an *in vitro* dialyzability technique, the values of percentage of Zn in the dialysates were lower than expected (11% or less). Although the *in vitro* dialyzability technique is recommended as the best *in vitro* method for estimating the absorption of Zn in the small intestine, several factors may affect the performance of the technique. The use of speciation tools have been demonstrated as a complementary analytical tool for validating *in vitro* methods for measuring bioaccessibility.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2014-54801-C2-1-R) and

the Community of Madrid/FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional)/ERDF (European Regional Development Fund, Madrid, Spain) programme (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM; Estrategias avanzadas para la mejora y control de la calidad y la seguridad de los alimentos/Advanced strategies for assessing quality and food safety, Madrid, Spain) for funding.

REFERENCES

- Alzate, A., M. C. Pérez-Conde, A. M. Gutiérrez, and C. Cámara. 2010. Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve. *Int. Dairy J.* 20:761–769.
- Bosscher, D., R. Van Cauwenberg, J. C. V. an der Auwera, H. Robberecht, and H. Deelstra. 2002. Calcium, iron and zinc availability from weaning meals. *Acta Paediatr.* 91:761–768.
- Brätter, P., I. Navarro, V. E. Negretti, and A. Raab. 1998. Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition. *Analyst* 123:821–826.
- Drago, S. R., and M. E. Valencia. 2004. Influence of components of infant formulas on *in vitro* iron, zinc and calcium availability. *J. Agric. Food Chem.* 52:3202–3207.
- European Commission. 1991. Commission Directive 91/321/EEC of 14 May 1991 on infant formulae and follow-on formulae. No. L175.
- Etcheverry, P., M. A. Grusak, and L. E. Fleige. 2012. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Front Physiol.* 3:317.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Scientific opinion on the appropriate age for introduction of complementary feeding of infants. *EFSA J.* 10.2903/j.efsa.2009.1423.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2014. Scientific opinion on dietary reference values for zinc. *EFSA J.* 10.2903/j.efsa.2014.3844.
- Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérida, and A. Pérez-Gálvez. 2009. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* 29:751–760.
- Guillem, A., A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M. J. Lagarda, and G. Clemente. 2000. *In vitro* Dialyzability of zinc from different salts used in the supplementation of infant formulas. *Biol. Trace Elem. Res.* 75:11–19.
- Harmaza, Y. H., and E. I. Slobozhanina. 2014. Zinc essentiality and toxicity. *Biophysical aspects. Biophysics (Oxf.)* 59:264–275.
- Hotz, C. 2005. Evidence of the usefulness of *in vitro* dialyzability, Caco-2 cell models animal models and algorithms to predict zinc bioavailability in humans. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 75:423–435.
- Krebs, N. F. 2000. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 130:1374–1377.
- Liang, J., B. Z. Han, M. J. Nout, and R. J. Hamer. 2010. *In vitro* solubility of calcium, iron and zinc in relation to phytic acid levels in rice-based consumer products in China. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61:40–51.
- Lönnerdal, B. 2014. Infant formula and infant nutrition: Bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 99:712S–717S.
- Moreda-Piñero, J., E. Alonso-Rodríguez, V. Romarís-Hortas, A. Moreda-Piñero, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, and P. Bermejo-Barrera. 2012. Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples. *Food Chem.* 130:552–560.
- Olivares, M., F. Pizarro, M. Ruz, and D. López de Romaña. 2012. Acute inhibition of iron bioavailability by zinc: Studies in human. *Biometals* 25:657–664.
- Palomo, M., A. M. Gutiérrez, M. C. Pérez-Conde, C. Cámara, and Y. Madrid. 2014. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. *Food Chem.* 164:371–379.
- Perales, S., R. Barberá, M. J. Lagarda, and R. Farré. 2006. Bioavailability of zinc from infant foods by *in vitro* methods (solubility,

- dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *J. Sci. Food Agric.* 86:971–978.
- Prasad, A. S. 1998. Zinc in human health: An update. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11:63–87.
- Roig, M. J., A. Alegró, R. Barbera, R. Farre, and M. J. Lagarda. 1999. Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chem.* 65:353–357.
- Singh, P., P. Surendra, and W. Aalbersberg. 2016. Bioavailability of Fe and Zn in selected legumes, cereals, meat and milk products consumed in Fiji. *Food Chem.* 207:125–131.
- Vandenplas, Y., I. Zakharova, and Y. Dmitrieva. 2015. Oligosaccharides in infant formula: More evidence to validate the role of prebiotics. *Br. J. Nutr.* 113:1339–1344.
- Wang, X., J. Zhou, P. S. Tong, and X. Y. Mao. 2011. Zinc-binding capacity of yak casein hydrolysate and the zinc-releasing characteristics of casein hydrolysate-zinc complexes. *J. Dairy Sci.* 94:2731–2740.
- WHO. 2009. Infant and young child feeding. Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland.

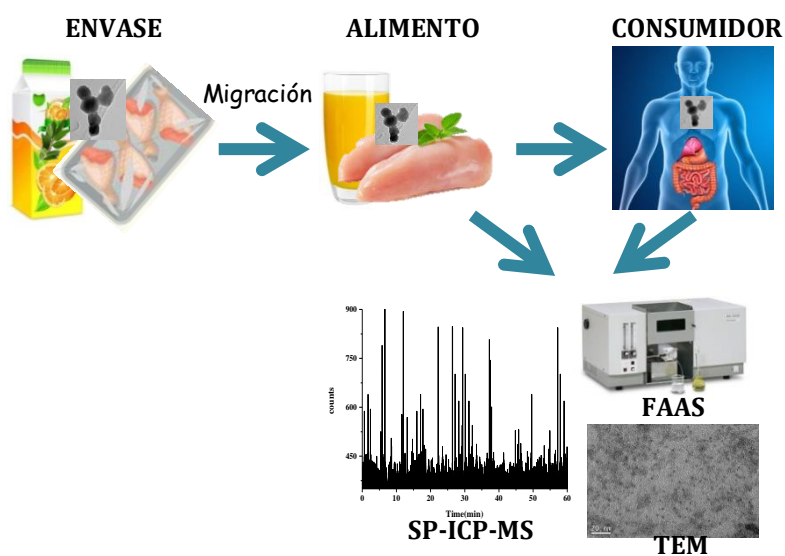
ARTÍCULO 4

ICP-MS en modo de detección de partículas individuales como técnica analítica para evaluar el efecto de la matriz alimentaria en las propiedades físico-químicas y la estabilidad en el tracto gastrointestinal de ZnONPs liberadas de envases alimentarios.

Using single-particle ICP-MS for unravelling the effect of type of food on the physicochemical properties and gastrointestinal stability of ZnONPs released from packaging materials.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Madrid, Y.

Anal. Chim. Acta, 2020, 1100, 12-21.



Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“XXI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA”. Valencia, España, Septiembre 2017. Tipo de comunicación: póster.

“9th INTERNATIONAL FRANCO-SPANISH WORKSHOP ON BIO-INORGANIC ANALYTICAL CHEMISTRY”. Huelva, España, Septiembre 2017. Tipo de comunicación: oral.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Using single-particle ICP-MS for unravelling the effect of type of food on the physicochemical properties and gastrointestinal stability of ZnONPs released from packaging materials

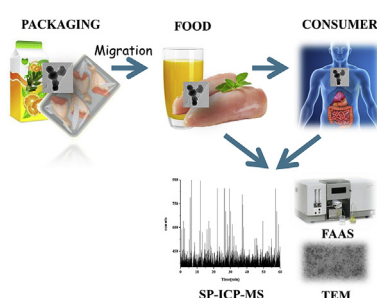
Beatriz Gomez-Gomez, Maria Teresa Perez-Corona, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- ZnONPs changes from packaging to the consumer were tracked by SP-ICP-MS and TEM.
- Food matrix notably decreases ZnONPs size favouring their dissolution.
- Ionic Zn limits the application of SP-ICP-MS in juice and gastric fluids.
- A 72% of ZnONPs that migrated to chicken were smaller than 95 nm.
- ZnONPs reach the intestine wall as small particles, aggregates and ionic form.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2019

Received in revised form

30 September 2019

Accepted 24 November 2019

Available online 28 November 2019

Keywords:

ZnO nanoparticles

Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS)

Orange juice

Chicken breast

In vitro gastrointestinal digestion

ABSTRACT

This article discusses the application of Single-Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (SP-ICP-MS) to study the effect of different types of food (orange juice and chicken breast) on the fate of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) migrated from two widely employed food packaging materials (polyethylene terephthalate (PET) and low density polyethylene (LDPE)). The gastrointestinal stability of ZnONPs was also evaluated. The idea behind this study is to track for first time the transformations underwent of nanoparticles in the different steps of their route from packaging to the consumer. The presence of high amount of dissolved zinc in the samples notably influenced size detection limit and the accuracy of SP-ICP-MS measurements. The diameter limits of detection (LODd) were 26 nm, 95 nm, 108 nm and 129 nm for aqueous solution, chicken breast extract and for oral and intestinal extracts, respectively. ZnONPs characterization in juice was not possible with SP-ICP-MS due to nanoparticles size was below LODd. Besides difficulties, SP-ICP-MS after extraction with Tris-HCl allowed us to determine that a 72% of the ZnONPs that migrated to chicken breast were smaller than 95 nm. Complementary to SP-ICP-MS, transmission electron microscopy (TEM) enabled to detect small nanoparticles (<3 nm). The combination of TEM and SP-ICP-MS measurements indicated that nanoparticles in chicken reach the intestine wall as small particles (<10 nm), as aggregates (>200 nm) and as ionic zinc whereas in case of juice only small nanoparticles (<3 nm) and ionic zinc were detected in the intestinal step.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of nanomaterials in the food sector has exponentially

* Corresponding author. Dept. of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Evaluación del efecto de nanopartículas metálicas y de metaloides sobre comportamientos bacterianos regulados por *quorum sensing* (QS). Formación de biopelículas bacterianas.

El crecimiento de biopelículas bacterianas en el ámbito industrial y doméstico supone un grave inconveniente tanto por el problema de salud pública que implican como por las pérdidas económicas que generan. La formación de biopelículas tiene especial importancia en el ámbito de la industria alimentaria, ya que pueden aparecer en superficies en contacto con los alimentos, en equipos de procesado y en el entorno y equipamiento del operario. Asimismo, el crecimiento de biopelículas en material quirúrgico, implantes médicos, catéteres, válvulas cardíacas y en otro tipo de materiales en el área clínica puede tener graves consecuencias, originando la aparición de enfermedades nosocomiales en el entorno hospitalario.

El crecimiento bacteriano en forma de biopelícula supone el desarrollo de un comportamiento social coordinado que está regulado por sofisticados sistemas de comunicación celular denominados *quorum sensing* (QS). Mediante estos sistemas, las células bacterianas, de la misma o diferente población, son capaces de producir señales extracelulares, y generar una respuesta que se traduce en un determinado comportamiento como es la formación de biopelículas bacterianas. Por tanto, la interrupción de estos procesos de comunicación microbiana sería una estrategia a considerar para evitar la formación de estas biopelículas en diferentes ambientes. En este sentido, el estudio del impacto de las nanopartículas en los sistemas de *quorum sensing* puede abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias que permitan inhibir o controlar la formación de biopelículas, ya que es frecuente que el empleo de antimicrobianos tradicionales no resulte adecuado para combatir este tipo de crecimiento microbiano. Por otra parte, conocer el efecto de las nanopartículas en los comportamientos cooperativos de las comunidades microbianas permitirá comprender el efecto que estos nanomateriales tienen sobre el medio ambiente. Esto es así puesto que muchas comunidades bacterianas que participan en diferentes ciclos biogeoquímicos desarrollan comportamientos colectivos regulados por sistemas de *quórum sensing* en respuesta a cambios ambientales.

En el primer trabajo de este capítulo (**Artículo 5**) que lleva por título **“Unravelling mechanism of bacterial quorum sensing disruption by metal-based nanoparticles”** (*Sci. Total Environ.*, 2019, 696, 133869), se evaluó el efecto de diferentes tipos de nanopartículas metálicas comerciales (AgNPs, TiO₂NPs, ZnONPs) en los sistemas de comunicación QS. Para la consecución de este objetivo, se emplearon dos cepas diferentes de la especie biosensora *Chromobacterium violaceum*: una cepa salvaje, *C. violaceum* ATCC 12472, y una cepa mutante, *C. violaceum* CV026. En esta bacteria Gram negativa tanto la producción de biopelícula como la producción de un pigmento morado, llamado violaceína, en presencia de la molécula señal N-acil homoserina lactonas (AHLs) están reguladas por QS. En el caso de la cepa mutante *C. violaceum* CV026, una mutación en el gen *cvlI* hace que esta bacteria no sea capaz de sintetizar AHLs pero sí de producir violaceína en respuesta a una concentración específica de AHL exógena.

Los resultados obtenidos evidenciaron que todas las nanopartículas ensayadas producían una disminución en violaceína producida por las dos cepas de *C. violaceum*. La magnitud de este efecto fue dependiente de la concentración y de las características físico-químicas de las nanopartículas. Hasta la fecha, los trabajos recogidos en la literatura científica sobre los efectos de distintos agentes inhibidores de QS se han limitado a cuantificar la disminución de violaceína presente en el medio de cultivo tras la exposición al agente inhibidor. Sin embargo, en el trabajo desarrollado en la presente Tesis doctoral se han combinado los resultados obtenidos en los ensayos realizados con la cepa salvaje y la cepa mutante de *C. violaceum*. Esta aproximación nos permitió establecer en qué etapa del proceso de QS ejercían su efecto las nanopartículas: en la biosíntesis de la molécula señal, en la acumulación, intercambio y transporte de esta señal o en su percepción y respuesta. Las conclusiones de este trabajo abren nuevas perspectivas sobre el mecanismo mediante el cual las nanopartículas afectan los sistemas de QS regulados por AHLs.

Además de la disrupción de los sistemas de *quorum sensing*, se han empleado otras aproximaciones para inhibir la formación de biopelículas como son impedir la adhesión inicial de los microorganismos a las superficies, alterar la estructura de la biopelícula para facilitar la acción de los agentes antimicrobianos o inducir la dispersión de los *biofilms*. En todos estos aspectos la nanotecnología puede tener un papel importante.

Recientemente está adquiriendo un interés notable el empleo de las nanopartículas de metaloides con el fin de inhibir o eliminar biopelículas de patógenos comunes. Este interés es debido, en gran medida, a su capacidad antimicrobiana y su

menor toxicidad en comparación con algunas de las nanopartículas metálicas consideradas anteriormente. Por ello, **en el segundo trabajo que se presenta en este capítulo (Artículo 6) y que lleva por título “Fate and effect of in-house synthesized tellurium based nanoparticles on bacterial biofilm biomass and architecture. Challenges for nanoparticles characterization in living systems”**, se evaluó la capacidad de nanopartículas basadas en telurio (TeNPs) para la inhibición y/o eliminación de biopelículas producidas por dos de los patógenos más comunes del ámbito alimentario: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Ambas bacterias pueden ocasionar problemas de seguridad alimentaria y, por tanto, poner en riesgo la salud del consumidor.

Es bien sabido que la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas depende de numerosos factores como el tamaño, la morfología, la carga superficial, la estructura cristalina y/o el estado de agregación de las mismas. Por todo ello, es esencial llevar a cabo una completa y correcta caracterización de las mismas. En el caso de las nanopartículas basadas en Te (TeNPs), esta etapa de caracterización adquiere especial importancia porque dichas nanopartículas se sintetizaron en el laboratorio, y porque además se dispone de muy poca información acerca de sus propiedades. La caracterización se realizó mediante la aplicación de una plataforma multitécnica que incluyó: técnicas basadas en la dispersión de luz, técnicas de microscopía y difracción de rayos X. Asimismo, también se aplicaron técnicas analíticas basadas en ICP-MS, como AF⁴-ICP-MS y la técnica de SP-ICP-MS, con el fin de obtener la distribución de tamaños de partícula y la concentración en número de partícula. Todas estas metodologías proporcionan información diferente pero complementaria.

Una vez caracterizadas las partículas se procedió a evaluar su impacto biológico en las biopelículas desarrolladas mediante la combinación de técnicas colorimétricas como el ensayo de tinción con cristal violeta (CV) y la microscopía confocal láser de barrido (CLSM). La primera de ellas permitió determinar los cambios en la biomasa total, mientras que la segunda posibilitó observar de manera directa las transformaciones provocadas en la estructura de la biopelícula a causa de su exposición a las TeNPs. Además, el tratamiento informático con el software bioImage_L de las imágenes obtenidas facilitó tanto la reconstrucción en 3D de la estructura de las biopelículas, tras su tratamiento con concentraciones crecientes de TeNPs, como el cálculo de parámetros asociados con la arquitectura de las mismas: el porcentaje de superficie colonizada, biovolumen y la distribución de las células viables.

La combinación del ensayo de tinción con cristal violeta junto con la microscopía confocal y el tratamiento de las imágenes a través de software específico, también se aplicó en el tercer trabajo (Artículo 7) que se presenta en este capítulo, y que lleva por título **“Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation” (Metallomics, 2019, 11, 1104)**. En este caso se estudió el impacto de las SeNPs y TeNPs en la inhibición y/o eliminación de la biopelícula formada por *Pseudomonas aeruginosa*. Este patógeno, además de aparecer en el entorno de la industria alimentaria, está también involucrado en numerosas infecciones nosocomiales adquiridas en el entorno hospitalario. La reconstrucción 3D de las imágenes adquiridas mediante CLSM evidenció que tanto las SeNPs como las TeNPs provocaban una importante alteración en la estructura de la biopelícula, inhibiendo la mayor parte del biovolumen del biofilm desarrollado en las placas de poliestireno. De forma análoga al primer trabajo presentado en este capítulo, se evaluó el efecto que tenían estas nanopartículas de metaloides en los sistemas de QS mediante el empleo de las dos cepas de la especie *C. violaceum*.

Los datos que se presentan en este capítulo sugieren que tanto las nanopartículas metálicas como las nanopartículas de metaloides tienen un fuerte impacto en los comportamientos colectivos desarrollados por las comunidades bacterianas. Esto indica que estos nanomateriales podrían considerarse como una alternativa eficaz para combatir la formación de biopelículas, y por tanto los riesgos asociados a la presencia de las mismas; pero, por otro lado, los resultados obtenidos también alertan de las consecuencias negativas que la liberación de estos nanomateriales pueden tener para las comunidades microbianas presentes en el medio ambiente, y que juegan un papel muy importante en el mismo.

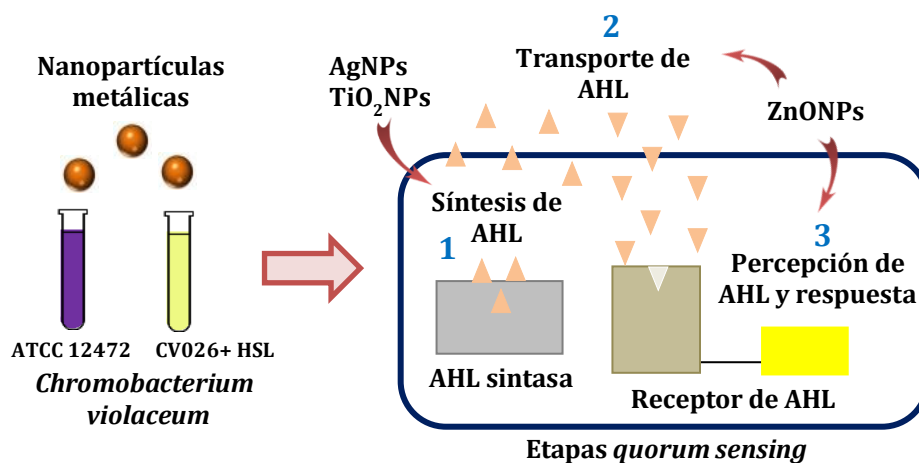
ARTÍCULO 5

Elucidación de los mecanismos responsables de la disrupción del *quorum sensing* bacteriano mediante nanopartículas metálicas

Unravelling mechanism of bacterial *quorum sensing* disruption by metal-based nanoparticles.

Gomez-Gomez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, T., Madrid, Y.

Sci. Total Environ., 2019, 696, 133869.



Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“IX International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology”. Zaragoza, España, Julio 2019. Tipo de comunicación: oral.



Unravelling mechanisms of bacterial quorum sensing disruption by metal-based nanoparticles

Beatriz Gómez-Gómez^a, Lucia Arregui^b, Susana Serrano^b, Antonio Santos^b, Teresa Pérez-Corona^a, Yolanda Madrid^{a,*}

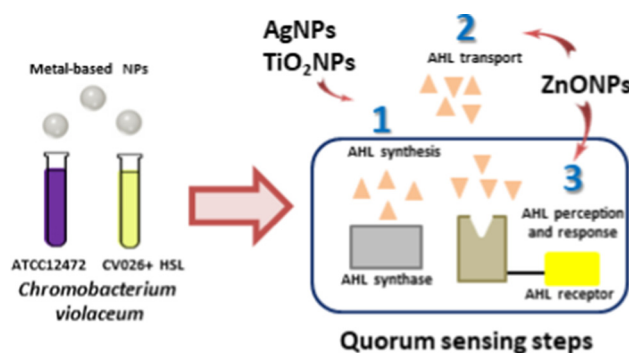
^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Genetics, Physiology and Microbiology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, José Antonio Novais 12, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Quorum sensing (QS) enables bacteria to adapt to environmental changes.
- Effect of metal-based nanoparticles on different targets of bacterial QS is given.
- Nanoparticles strongly affect different stages AHL bacterial QS system
- TiO₂NPs and AgNPs mainly affected the biosynthesis of AHLs QS signal molecules.
- ZnONPs mainly disrupted the QS steps related to signal perception and response.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2019

Received in revised form 9 August 2019

Accepted 9 August 2019

Available online 10 August 2019

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

Zinc oxide nanoparticles
Titanium dioxide nanoparticles
Silver nanoparticles
Quorum sensing
Environmental concerns
Chromobacterium violaceum

ABSTRACT

Nanoparticles are released in the environment causing a negative impact in several ecosystems such as microbial communities. To adapt to environmental changes some bacteria use a collective behaviour ruled by a cell-to-cell communication process called quorum sensing (QS). In this study, the impact of some of the most employed metal-based nanoparticles, such as zinc oxide nanoparticles (ZnONPs), titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) and silver nanoparticles (AgNPs) on bacterial QS has been assessed by using two different strains of the model organism *Chromobacterium violaceum* and by employing different experimental conditions. TiO₂NPs were tested with and without applying a previous step of UV-irradiation while the effect of AgNPs of two diameter sizes (40 and 60 nm) and two different coating agents (PVP and citrate) was evaluated. Results evidenced that all nanoparticles produced a significant effect on violacein production and therefore, in the QS system. ZnONPs mainly disrupted the QS steps related to signal perception and response whereas TiO₂NPs and AgNPs affected the autoinducer biosynthesis. AgNPs with the smallest size and citrate as capping agent produced the most deleterious effect while the impact of TiO₂NPs was not affected by UV irradiation. The present study provides new insights into the mechanisms by which these commonly employed metal-based nanoparticles disturb bacterial QS-based communication and clearly evidences the potential risk of releasing nanoparticles to the environment, especially for microbial communities which play a key role in many environmental and technological processes.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

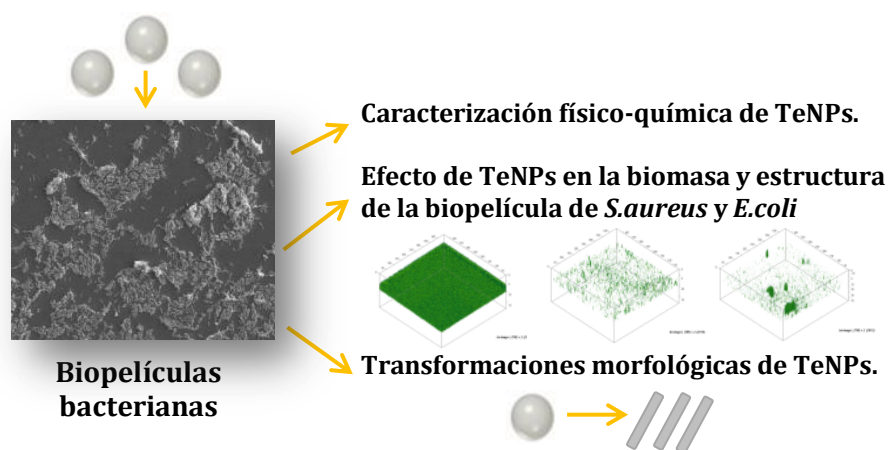
ARTÍCULO 6

Efecto de nanopartículas basadas en telurio en la biomasa y arquitectura de biopelículas bacterianas. Dificultades asociadas a la caracterización de nanopartículas en organismos vivos.

Effect of in-house synthesized tellurium based nanoparticles on bacterial biofilm biomass and architecture. Challenges for nanoparticles characterization in living systems.

Gómez-Gómez, B., Sanz-Landaluze, J., Pérez-Corona, T., Madrid, Y.

Sci. Total. Environ. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137501> (Aceptado)



Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“EUROPEAN WINTER CONFERENCE ON PLASMA SPECTROCHEMISTRY”. Pau, Francia, Febrero 2019. Tipo de comunicación: póster.

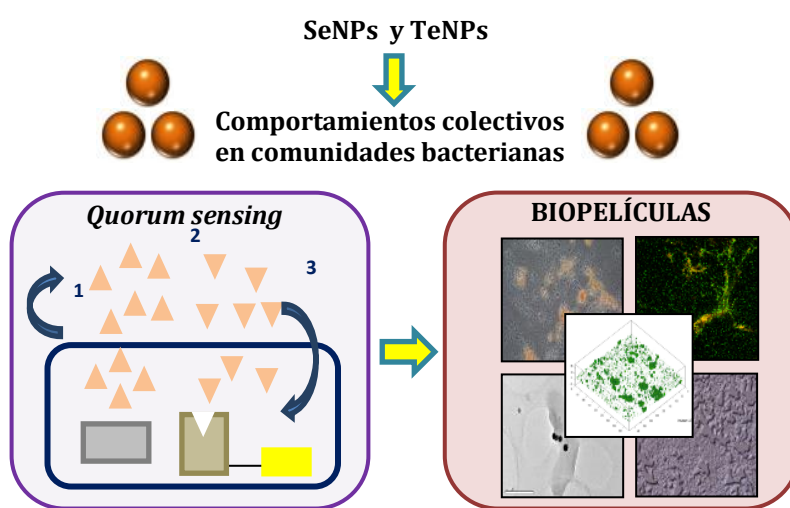
ARTÍCULO 7

Alteración de los procesos regulados por *quorum sensing*, producción de violaceína y formación de biopelículas bacterianas, por nanopartículas de selenio y telurio

Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in *quorum sensing*-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation.

Gómez-Gómez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, T., Madrid, Y.

Metallomics, 2019, 11, 1104.



Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“ISEAC-40 INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL & FOOD MONITORING”.

Santiago de Compostela, España, Junio 2018. Tipo de comunicación: oral.



Cite this: *Metallomics*, 2019, 11, 1104

Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation

Beatriz Gómez-Gómez,^a Lucia Arregui,^b Susana Serrano,^b Antonio Santos,^b Teresa Pérez-Corona^a and Yolanda Madrid^{a*}

A cell-to-cell communication system called quorum sensing (QS) promotes the transcription of certain target genes in bacterial cells leading to the activation of different cellular processes, some of them related to bacterial biofilm formation. The formation of bacterial biofilms favours antibiotic resistance, which is nowadays a significant public-health problem. In this study, the effect of selenium (SeNPs) and tellurium (TeNPs) nanoparticles was examined in two bacterial processes mediated by QS: violacein production by *Chromobacterium violaceum* and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. For this purpose, quantification of the pigment production in the presence of these nanoparticles was monitored using the *C. violaceum* strain. Additionally, a combination of different microscopical imaging techniques was applied to examine the changes in the 3D biofilm structure of *P. aeruginosa*, which were quantified through performing architectural metric calculations (substratum area, cell area coverage and biovolume). SeNPs produce an 80% inhibition in the violacein production by *C. violaceum* and a significant effect on the *P. aeruginosa* biofilm architecture (a reduction of 80% in the biovolume of the bacterial biofilm was obtained). TeNPs similarly affect violacein production and the *P. aeruginosa* biofilm structure but at lower concentration levels. The results obtained suggest an important disruption of the QS signalling system by SeNPs and TeNPs, supporting nanotechnology as a promising tool to fight against the emerging problem of bacterial resistance related to bacterial biofilm formation.

Received 25th February 2019,
Accepted 16th April 2019

DOI: 10.1039/c9mt00044e

rsc.li/metallomics

Significance to metallomics

The interaction between nanoparticles and bacterial cells as individual entities has been extensively evaluated. However, in many persistent infections bacteria behave as a cooperative group of bacterial cells coordinated through a quorum sensing (QS) signalling system that favours, among other factors, the formation of bacteria biofilms. This strategy provides bacteria resistance to host defences or antibiotic treatments. This study presents for first time the effect of SeNPs and TeNPs on different process regulated by QS. Understanding the interaction between nanoparticles and bacterial community behaviour will allow developing new and more efficient strategies for controlling bacterial persistent infections.

1. Introduction

Several bacterial processes are ruled through a cell-to-cell communication system by means of releasing chemical signal molecules called autoinducers, in a cell density dependent process known as quorum sensing (QS). One of the main

groups of autoinducers identified as QS signalling molecules in Gram-negative bacteria is the *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs). When the microbial population reaches high density, these molecules link to specific receptors promoting the expression of genes related to specific responses such as the production of violacein, antibiotic resistance, biofilm formation and interaction with the host.^{1–3} Pathogenic bacteria could establish a persistent infection when they adopt a biofilm mode of growth, which results in increased resistance to antibiotics. Biofilm formation involves the growth of microbial communities attached to a surface and embedded in a self-produced polymeric matrix, providing structural stability along with resistance against traditional

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Av. Complutense s/n 28040, Madrid, Spain. E-mail: ymadrid@ucm.es; Fax: +34913944329; Tel: +34913945145

^b Department of Genetics, Physiology and Microbiology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, José Antonio Novais 12, 28040 Madrid, Spain

antimicrobial agents.^{4–6} Disruption of the QS signal is currently explored as an alternative strategy to fight against microbial resistance.⁷ In this context, nanotechnology has been considered as a promising approach to tackle persistent bacterial infections. Metal and metal oxide nanoparticles such as silver, copper, zinc oxide and copper oxide nanoparticles are gaining large interest within the scientific community as is shown in the increasing number of articles in which their potential antimicrobial activity is reported.^{8–10} Furthermore, metal/metal oxide nanoparticles are expected not only to inhibit bacterial growth but also to avoid antibiotic resistance mechanisms due to their interaction with bacterial cells through different pathways.⁹ Likewise, less explored nanoparticles such as metalloid nanostructures have been synthesized at laboratory scale for use as new antimicrobial nanomaterials with more effectiveness and less toxicity for human cells. For example, selenium nanoparticles (SeNPs) have been revealed as interesting tools due to their antioxidant, anticarcinogenic and antimicrobial properties together with their low toxicity compared with other nanoparticles such as AgNPs and even with other selenium compounds.¹¹ Tellurium compounds can be found in applications related to solar panels, glasses, rubber, rechargeable batteries, and semiconductors and they have been also evaluated for their potential antimicrobial, anti-inflammatory and anticarcinogenic effects; therefore, although less investigated, they have been gaining attention for electronics, biotechnology and medical applications.^{12,13}

Most of the articles published in the literature on the antimicrobial activity of nanoparticles are focused on their effect in planktonic cultures or in biofilm inhibition.^{14–21} However, more studies need to be performed with the aim of understanding how nanoparticles affect bacterial environments in which bacterial QS plays a key role. Evaluating the effect of metal-based nanoparticles in processes regulated by QS along with information on the effect of nanoparticles towards biofilm structure parameters will provide better knowledge of their effect on bacterial community behaviours that may allow researchers to develop new strategies for controlling biofilm development and consequently to control bacterial resistance.

Hence, in this study the potential of SeNPs and TeNPs for inhibiting different processes regulated by QS (violacein production and biofilm development) was evaluated with the aim of giving deeper insight into the influence of these nanoparticles on bacterial communication. The inhibition of violacein production of *C. violaceum* by these nanoparticles was assessed by using two different strains, one of them being an AHL-deficient mutant. Furthermore, the antibiofilm potential of SeNPs and TeNPs was also proved against a strain of *P. aeruginosa*, paying special attention to the changes induced by these nanoparticles in the structure of the biofilm. For this purpose, data from the crystal violet staining assay were combined with the information provided by a panel of imaging techniques including traditional microscopy techniques such as electron (TEM) and optical microscopy (DICM and PCM), and advanced imaging techniques such as confocal laser

scanning microscopy (CLSM) together with digital image processing.

2. Methods

2.1 Synthesis, purification and characterization of selenium nanoparticles and tellurium nanoparticles

SeNPs were synthesized following the procedure described by Palomo *et al.* (2017).²² The method is based on the chemical reduction of sodium selenite with ascorbic acid in the presence of hydroxyethyl cellulose (HEC) as a coating agent. In the case of TeNPs, a similar procedure was applied but the chemical reduction of tellurium salt (K_2TeO_3) was performed with gallic acid and, similarly, HEC was employed as a coating agent. The resulting SeNPs and TeNPs were purified through a dialysis process and characterized in terms of size and composition by a TEM (JEOL JEM 2100; USA) equipped with an Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDXS) microanalysis composition system (Oxford Inca). More than 1500 SeNPs and TeNPs dispersed in about 20 TEM photos were viewed to measure the size distribution either in water or in LB media.

2.2 Bacterial strain culture

Two *C. violaceum* strains were used: *C. violaceum* ATCC 12472 and the AHL-deficient mutant CV026. Both strains were aerobically cultured in 15 mL Falcon[®] with LB media at 30 °C for 14–18 h under stirring conditions (120 rpm). The optical density (OD) of the bacterial cultures was adjusted to 0.2 at 620 nm before performing the QS inhibition experiments. Likewise, *P. aeruginosa* cultures (Department of Genetics, Physiology and Microbiology culture collection) were grown and the resulting bacterial suspensions were diluted with LB to reach an optical density (OD) value of 0.1 at 620 nm before performing biofilm assays.

2.3 Violacein production assays

The *C. violaceum* ATCC 12472 strain produces the pigment violacein in a QS mediated process induced by *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) while the CV026 strain is deficient in the autoinducer synthase requiring the exogenous addition of AHL to produce violacein. Both strains are usually employed for evaluating the QS inhibition of different substances.^{23–26}

Both strains of *C. violaceum* (0.2 OD at λ_{620nm}) were cultivated simultaneously in the presence of 0, 10, 100 and 250 mg Se L⁻¹ in sterile Eppendorf tubes. For the experiments carried out with TeNPs, lower concentrations were added to the bacterial cultures (10, 50, 100 and 250 μ g Te L⁻¹) as they exhibit higher toxicity against *C. violaceum*. Tubes were subsequently incubated at 30 °C under shaking at 120 rpm for 24 h. Eight replicates were performed for each concentration. The same protocol was applied when using the strain CV026, although, in order to induce the violacein production, the autoinducer *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) (Sigma-Aldrich) (10 mM) was previously added to the culture media.

After 24 h incubation, tubes were centrifuged at 13 000 rpm for 15 min to allow the insoluble violacein to settle. Afterwards, 1 mL of DMSO was added to the resulting pellet. The mixture was vortexed until the violacein was completely solubilized and centrifuged at 13 000 rpm for 10 min. 250 μ L of supernatant containing the solubilized violacein was placed in a 96 flat-bottom well microtiter plate. The absorbance was measured with a microplate reader at a wavelength of 570 nm.

To check whether changes in violacein production were related to modifications in QS processes or were due to a decrease in cell viability produced by the antibacterial activity of SeNPs, strains of ATCC 12472 and CV026 were incubated with different concentrations of SeNPs (0, 10, 100 and 250 mg Se L⁻¹) and TeNPs (0, 10, 50, 100 and 250 μ g L⁻¹) for 24 h. After that, an aliquot of each culture was serially diluted and 100 μ L was spread on LB-agar plates. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the grown bacterial CFU (Colony Forming Units) were counted.

2.4 Biofilm development in the presence of SeNPs and TeNPs. Crystal violet assays

The effect of SeNPs and TeNPs on *P. aeruginosa* biofilm formation was evaluated at different nanoparticle concentrations: 10, 100 and 250 mg Se L⁻¹ and 0.1, 0.5, 1, 5, 25, 50 and 75 mg Te L⁻¹. The experiments were conducted following the procedure described by Merritt *et al.* (2011).²⁷ 25 μ L of a SeNP or TeNP dispersion was placed into a well of a sterile polystyrene non-treated 96 flat-bottom well microtiter plate (Costar) before adding 75 μ L of the diluted *P. aeruginosa* culture (0.1 OD₆₂₀). Then the plates were incubated at 28 °C under stirring (120 rpm) for 24 h. Eight replicates of each experiment were done and a negative (LB medium) and a positive control (diluted bacterial culture without adding selenium or tellurium) were performed in parallel. Afterwards, non-adherent bacterial cell suspensions were discarded. The biofilm adhered to the wells was subsequently stained with 125 μ L of 0.1% (w/v) crystal violet solution and kept in darkness for 15 min. The excess dye in the plates was removed with Milli Q-water. Finally, 200 μ L of glacial acetic acid 30% (w/v) was added to each stained well to dissolve the stain adsorbed to the bacterial biofilm. The absorbance was then measured at 570 nm at room temperature by using a Varioskan LUX Multi-mode Microplate Reader (Thermo-Fisher). The average of the results was compared with those obtained from the positive controls.

The capability of SeNPs and TeNPs for removing biofilms once formed was assessed according to the procedure previously described with a slight modification. In this case, biofilms were first developed and SeNPs or TeNPs were subsequently added.

2.5 Microscopic analysis of bacterial biofilms

The effect of SeNPs and TeNPs on the *P. aeruginosa* biofilm architecture was evaluated by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM, Leica SP2 with a Leica DFC 350 FX digital camera). For this purpose, biofilms were grown in flat bottom sterile non-treated 24-well plates (Thermo Fisher Scientific) in the presence of SeNPs at 10, 100 and 250 mg Se L⁻¹ and TeNPs at 1, 25 and 125 mg Te L⁻¹. Once the incubation period was

completed, the supernatant with non-adherent cells was carefully removed and the biofilm was stained with SYTO 9 and PI fluorescent dyes. After 15 min incubation, between four and six CLSM image stacks of each plate were acquired from random positions using a 20 \times lens leading to a total area under investigation of 7.76–11.64 $\times 10^5 \mu\text{m}^2$. Images were collected at 2 μ m intervals from the bottom of the surface of the plate to the top of the biofilm, and the number of images in each stack varied according to the thickness of the biofilm. All the images were collected with a resolution of 1024 \times 1024 pixels. Images stacks were evaluated by using the Image J and bioImage L v.2.1 software packages.²⁸

Additional information on the structural changes of the biofilm by nanoparticles was obtained by applying Differential Interference Contrast (DICM, Nikon Eclipse 80i with a Nikon Digital Sight DS-Fi1 camera) and Phase Contrast (PCM, Olympus BX50 with a Canon Power Shot A620 digital camera) microscopy.

2.6 Statistical analysis

The results obtained from the experiments were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistically significant differences between groups were detected by a two-way analysis of variance (ANOVA) and by using Statgraphics v6.0 software (Manugistics, Rockville, USA). Only results with a *p*-value of less than 0.05 were considered to be statistically significantly different.

3. Results and discussion

3.1 Effect of Luria–Bertani culture medium on nanoparticle stability

SeNPs and TeNPs were successfully synthesized through the procedure described in Section 2.1. TEM micrographs evidenced the presence of spherical and dispersed SeNPs and TeNPs with an average diameter size of 90 \pm 10 and 125 \pm 40 nm respectively. Furthermore, EDXS analysis confirmed the presence of Se (L α (1.4 keV), K α (11.22 keV) and K β (12.49 keV)) and Te (L α (3.77 keV), K α (27.47 keV) and K β (31.72 keV)), in both cases (Fig. 1a and c). Additionally, the electron diffraction pattern confirmed the non-microcrystalline structure of both types of nanoparticles. The nanoparticles were also characterized in LB with the aim of assessing their stability in the presence of the culture medium used for growing the bacteria: 85 \pm 15 nm and 130 \pm 35 nm were the average diameter size for SeNPs and TeNPs respectively. No significant differences between the average diameter size and morphology of SeNPs and TeNPs dispersed in the synthesis media (Fig. 1a and c) and in LBS media (Fig. 1b and d) were detected.

3.2 Effect of SeNPs and TeNPs on *C. violaceum* quorum sensing regulated violacein production

During recent years, disruption of the QS signal has been explored as new strategy for antimicrobial therapy with the aim of opening new alternatives to fight against microbial resistance. Briefly, the repression of cell-to-cell communication may take place at three different levels: (i) by inhibiting the

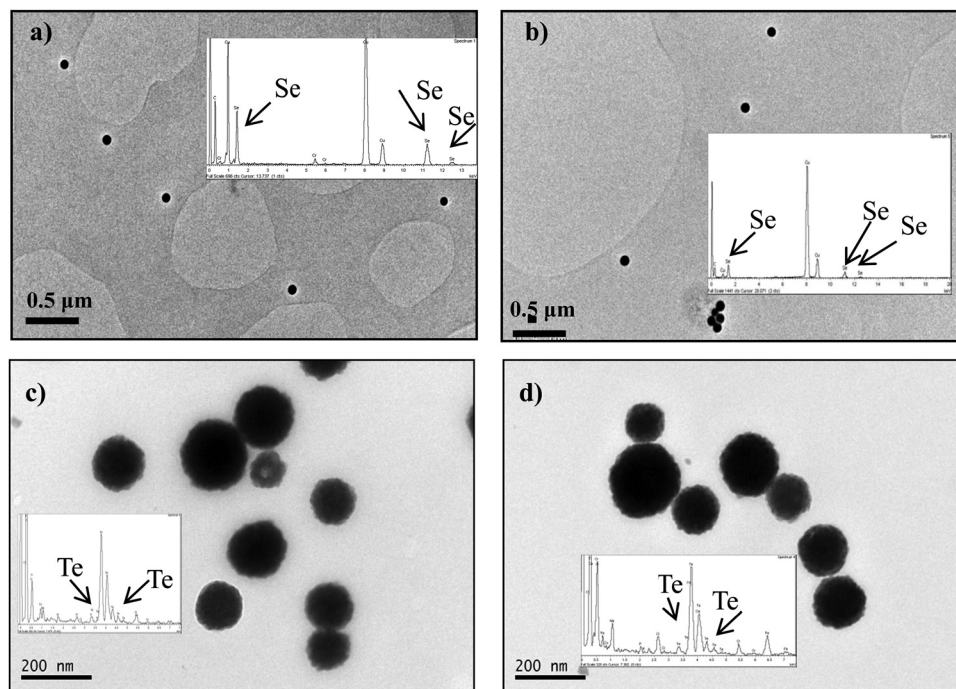


Fig. 1 Transmission electron microscopy (TEM) images and X-ray energy dispersive spectroscopy (EDXS) spectrum of SeNPs and TeNPs dispersed in (a and c) synthesis and (b and d) LB media.

synthesis of signal molecules, (ii) by limiting the accumulation, exchange and transport of the QS signal and (iii) by disturbing signal perception and response (Fig. 2a).²⁹ Most of the reported studies on the effect of nanoparticles on QS processes have been focused on quantifying the modification of the QS signal instead of evaluating at what stage cell-to-cell communication is disturbed. In this sense, *C. violaceum* has been widely employed as a model organism in QS research due to its capacity for producing the purple pigment violacein through a QS regulated process.^{23–26} In the current study, a simple procedure was applied to evaluate at which stage nanoparticles alter the QS process. For instance, a decrease in violacein production by the strain ATCC 12472 accompanied by no variation in violacein production by the CV026 mutant strain suggests a disruption of the biosynthesis production of the autoinducer (Fig. 2a step i). In contrast, a decrease in violacein production by CV026 in the presence of AHL indicates that the recognition of the QS signal and reception might be interfered with as long as the production of the purple pigment in the strain ATCC 12472 is not decreased. To understand the last statement, it is important to keep in mind that CV026 cannot produce the QS signal responsible for the violacein production (Fig. 2a step ii and iii).

Fig. 2b evidences an 80% decrease in violacein production by the ATCC 12472 strain in the presence of 250 mg Se L^{-1} while the pigment production was kept constant by the CV026 strain where the exogenous addition of C6-HSL is not needed as this strain is able to intrinsically produce violacein as stated in Methods (Section 2.3). Moreover, it was proved that the viability of both strains remains unaffected during the experiment with

SeNPs (Fig. 2c and d). Therefore, the changes in violacein production seem not to be a consequence of cell population density reduction and may be related to the interruption of bacterial QS. Consequently, in agreement with our previous statement, SeNPs might affect to a greater extent the biosynthesis of the autoinducer (Fig. 2a step i) rather than disturbing signal perception and response (Fig. 2b step ii and iii).

Regarding TeNPs, $50 \text{ } \mu\text{g Te L}^{-1}$ of TeNPs was enough to inhibit 70% of the violacein production by CV026 while the pigment production was kept constant by the ATCC 12472 strain. However, a higher concentration of TeNPs caused inhibition of 80% of the violacein production in both CV026 and ATCC 12472 (Fig. 3a). As for SeNPs, the viability of both strains remains unaltered during the experiment (Fig. 3c and c). According to the aforementioned comments, the presence of TeNPs at a concentration level of $50 \text{ } \mu\text{g Te L}^{-1}$ mainly affects processes related to the signal perception and response rather than those linked with the synthesis of the autoinducer. Nevertheless, when higher levels of TeNPs were used to supplement the bacterial culture it was not possible to determine which of the QS steps was disturbed to a greater extent since both strains were similarly altered.

It is worth mentioning that the presence of nanoparticles of different composition leads to different responses in the QS system. SeNPs might affect to a greater extent the biosynthesis production of the autoinducer whereas TeNPs seem to disturb the signal perception and response. Moreover, differences in the quantity of nanoparticles that is needed to reach one of the responses were also observed. No changes in the violacein production of CV026 were achieved in the presence of 250 mg Se L^{-1}

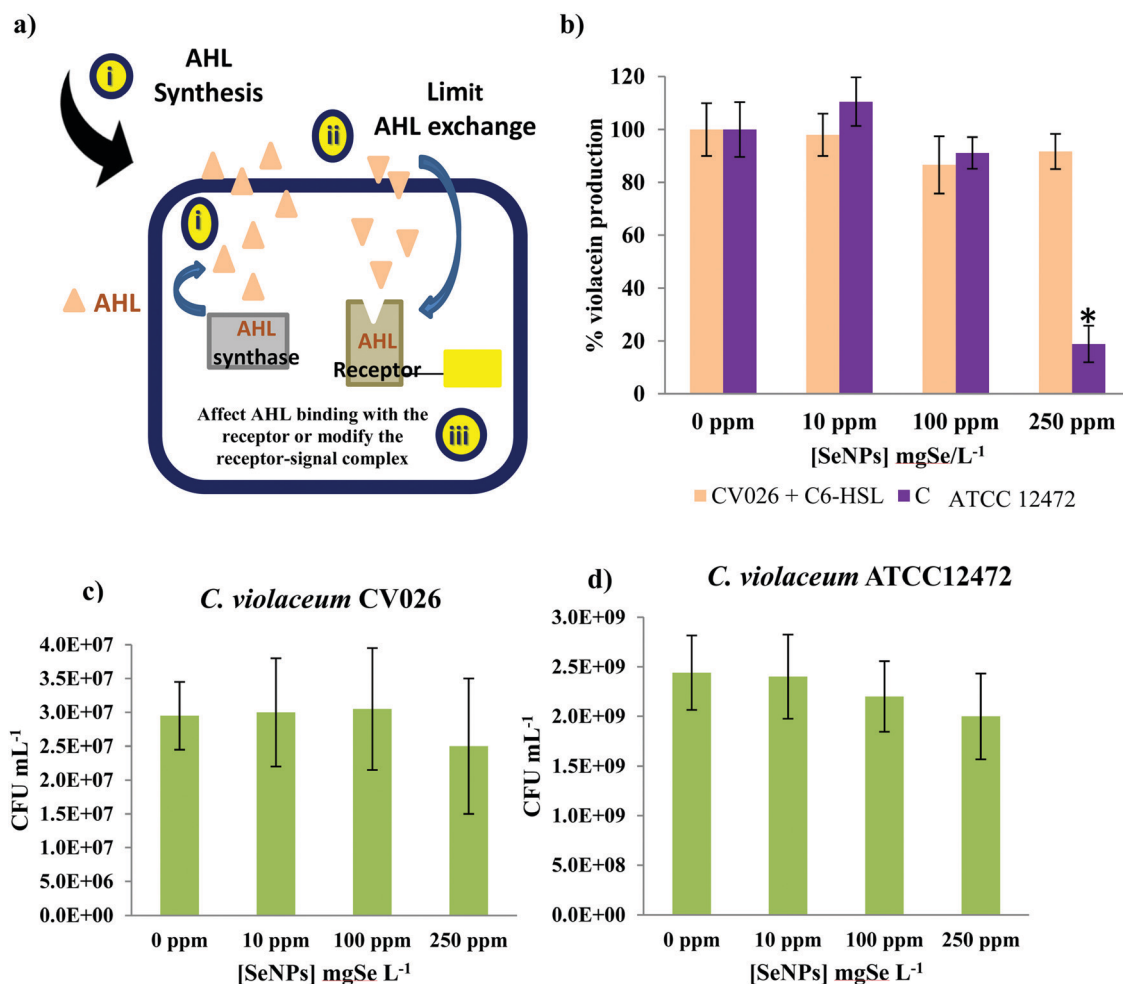


Fig. 2 (a) QS-signal pathways that can be affected by nanoparticles (adapted from Grandclement *et al.* (2015)²⁹). (b) Evaluation of violacein production by *C. violaceum* (ATCC 12472 and CV026) in the presence of different concentrations of SeNPs. Bacterial CFU counted from the viability test of *C. violaceum* CV026 (c) and *C. violaceum* ATCC 12472 (d). Columns with asterisks (*) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the control and the tested concentrations.

of SeNPs while only $50 \mu\text{g Te L}^{-1}$ of TeNPs were needed for decreasing the violacein production in this strain. Moreover, the violacein production by ATCC 12472 was modified in the presence of 250 mg Se L^{-1} while only $100 \mu\text{g Te L}^{-1}$ of TeNPs were required to reach the same effect.

3.3 Antibiofilm activity of SeNPs and TeNPs assessed by the colorimetric method

Another process regulated by QS is the formation of biofilms, which represents a key step in the pathogenicity of many bacterial species. In the current study, the antibiofilm activity of SeNPs and TeNPs on *P. aeruginosa* was assessed by using the colorimetric method described in Section 2.4. Fig. 4a shows that the production of a biofilm by *P. aeruginosa* was significantly inhibited in the presence of 100 mg Se L^{-1} as SeNPs (Fig. 3a) suggesting a reduction of 60% of the biofilm developed by the bacteria. Furthermore, the presence of 250 mg Se L^{-1} SeNPs exhibits an increased ability to inhibit biofilm formation by more than 70%. No changes in the *P. aeruginosa* viability were observed when the cultures were exposed to the assayed

NP concentrations (data not shown); therefore the changes in the developed biofilms were not due to a reduction of the bacterial population density. However, when the biofilm was previously formed (Fig. 4b), only 15% biofilm reduction in the presence of 250 mg Se L^{-1} was achieved. Therefore, from the results obtained for both experiments it can be highlighted that SeNPs showed more effectiveness in inhibiting biofilm development rather than in removing the biofilms once formed. This fact agrees with our previous results, in which SeNPs showed the ability of interrupting bacterial QS at a certain step (disruption of the biosynthesis production of the autoinducer) and thus to interfere with biofilm formation. On the other side, when a biofilm is already formed, the QS signalling is a less critical stage and SeNPs are less effective in removing pre-established biofilms.

With reference to experiments carried out with TeNPs, an 80% biofilm reduction was evidenced at concentration levels higher than 25 mg Te L^{-1} (Fig. 4c). Once again, the population density of *P. aeruginosa* was not affected by the NP concentrations employed (data not shown). In contrast to SeNPs, Fig. 4d

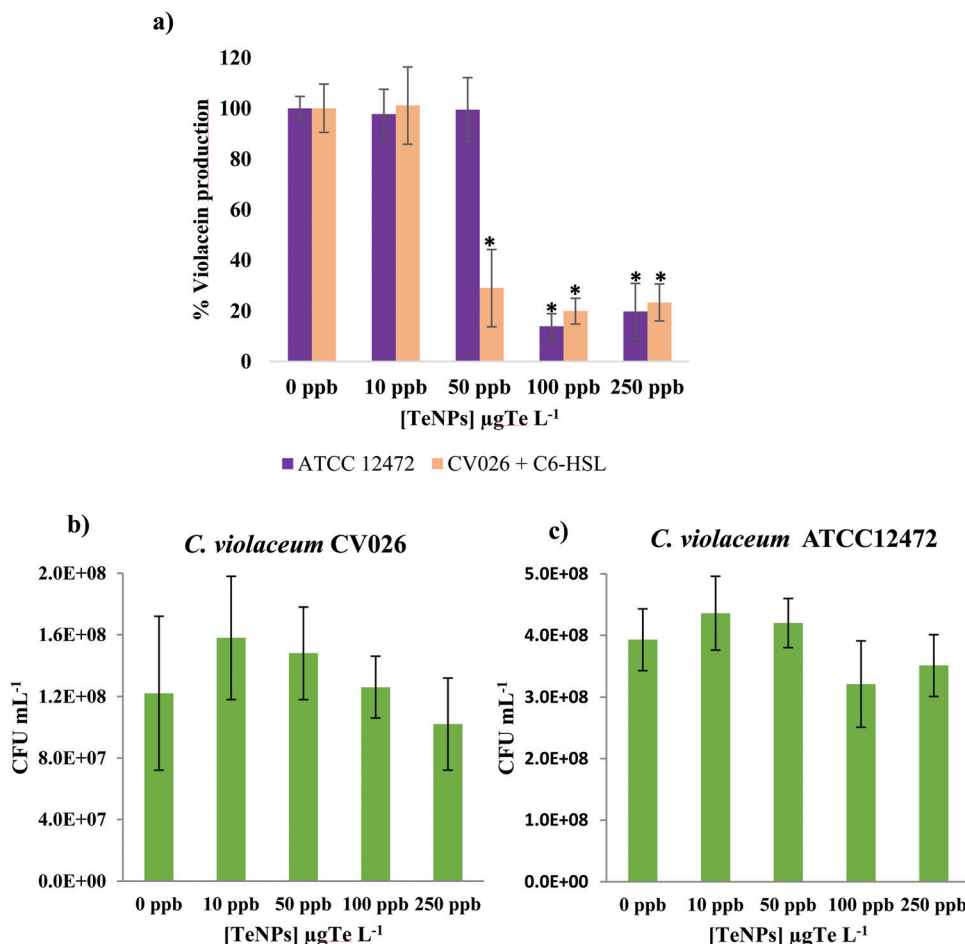


Fig. 3 (a) Evaluation of violacein production by *Chromobacterium violaceum* (ATCC 12472 and CV026) in the presence of different concentrations of TeNPs. Bacterial CFU counted from the viability test of *C. violaceum* CV026 (b) and *C. violaceum* ATCC 12472 (c). Columns with asterisks (*) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the control and the tested concentrations.

shows that a $0.1\text{--}5\text{ mg Te L}^{-1}$ concentration of TeNPs was able to reduce just 30% of the biofilm once formed. In this particular case, it was difficult to establish a correlation between the *C. violaceum* and *P. aeruginosa* data since at concentration levels higher than 5 mg L^{-1} it was not possible to determine which QS step was disturbed to a greater extent, since, as it was previously mentioned, both strains (ATCC 12472 and CV026) were similarly altered.

However, it is important to point out the presence of a black colour in those wells where TeNPs were supplemented with more than 5 mg Te L^{-1} and after 24 h of culture incubation in biofilm removing experiments. This fact led to erroneous absorbance readings when performing colorimetric experiments, giving non-accurate results, which might explain the increase of the percentage of biofilm formation observed at concentrations higher than 5 mg Te L^{-1} (Fig. 4d). Changes in the colour of the growing biofilm from nearly colourless to deep black can be explained by the presence of biogenic tellurium nanostructures. Fig. 4e shows how *P. aeruginosa* was able to modify the shape of tellurium nanoparticles from spherical to nanorod structures, the latter being responsible for the black colour of the solution. This fact, the transformation of metal

and metalloid ions into extracellular nanomaterials by bacterial cells (and also biofilms), has been previously reported as a mechanism to reduce toxicity.¹³ However, as far as we know, this particular morphological transformation from spherical TeNPs to nanorods after being exposed to *P. aeruginosa* biofilms has not been reported to date. Sinha *et al.* (2014) and Gates *et al.* (2002) described a similar process by which selenium nanorods can be formed from selenium nanospheres as an aggregation and dissolution process.^{30,31} So, a similar mechanism could likely occur when spherical TeNPs are in contact with *P. aeruginosa* biofilms, and this transformation can be explained by the lower toxicity of the nanorod structures. The fact that the black colour only appeared when a bacterial biofilm was present suggests that the bacterial biofilm was responsible for the nanosphere transformation into nanorods instead of planktonic bacterial cells.

3.4 Effect of SeNPs and TeNPs on the biofilm architecture evaluated by different imaging approaches

Previous results have demonstrated that SeNPs and TeNPs disturb biofilm production. The crystal violet colorimetric assay enables the quantification of developed biofilms but it does not

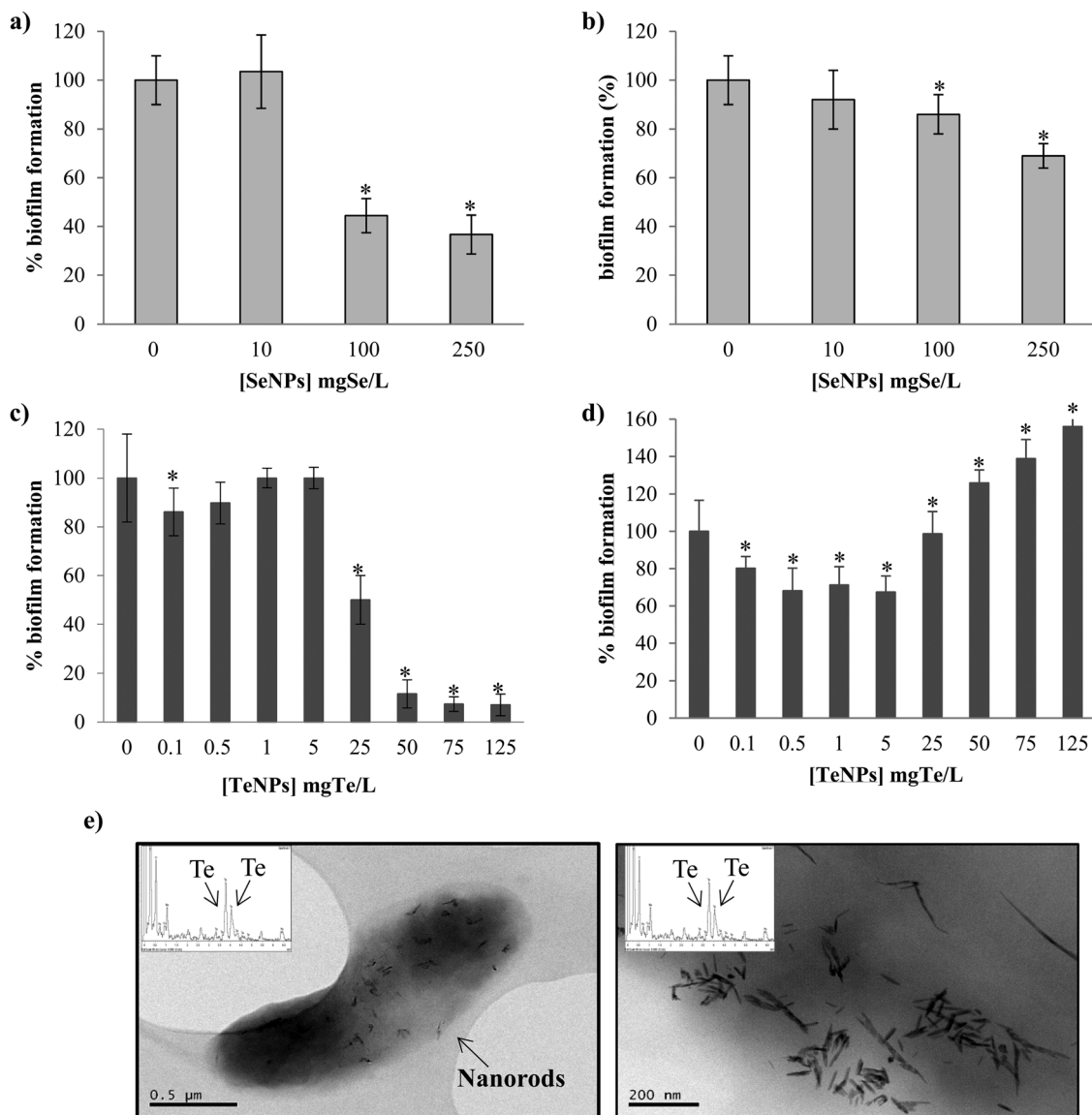


Fig. 4 Percentage of biofilm formation related to the inhibition assay with *P. aeruginosa* (a and c) and biofilm removing ability (b and d) in the presence of increasing concentrations of SeNPs and TeNPs respectively. (e) Biogenic tellurium nanorods observed when concentrations over 5 mg Te L⁻¹ of TeNPs were employed. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 8$). Wells where a biofilm was produced in the absence of SeNPs or TeNPs were labelled as the zero point of concentration and designed as the control. Columns with asterisks (*) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the control and the tested concentrations.

allow examining the structural properties of the biofilm, which is needed for properly evaluating changes induced in the architecture and cell distribution in the biofilm. Therefore, the impact of nanoparticles on a *P. aeruginosa* mature biofilm was evaluated by different imaging techniques: CLSM, DICM and PCM. Fig. 5(a and b) show 3D projections and CLSM micrographs respectively of the *P. aeruginosa* biofilm structure, with or without SeNPs and after 24 h of incubation time. CLSM imaging clearly revealed a highly heterogeneous structure of the biofilm in the absence of SeNPs, rendering a low substratum coverage percentage (Table 1). From the obtained images, bacterial cells seemed to be accumulated around the network structure of the extracellular polymeric substances (EPS)

produced by the bacteria. However, the presence of SeNPs notably altered the microbial biofilm structure with respect to the control. As shown, in the presence of SeNPs, *P. aeruginosa* developed a heterogeneous structure containing discrete separate micro-aggregates. These significant changes in the 3D biofilm architecture led to up to a 98% reduction in biovolume (the overall volume of cells in the observation field) as the SeNP concentration increases (Table 1). Despite the striking reduction in biovolume, the percentage of viable cells in the biofilm remained constant or slightly decreased with increasing SeNP concentration (Table 1). This fact was corroborated by performing a viability analysis on the biofilm treated with SeNPs using fluorescent dyes (data not shown). In parallel

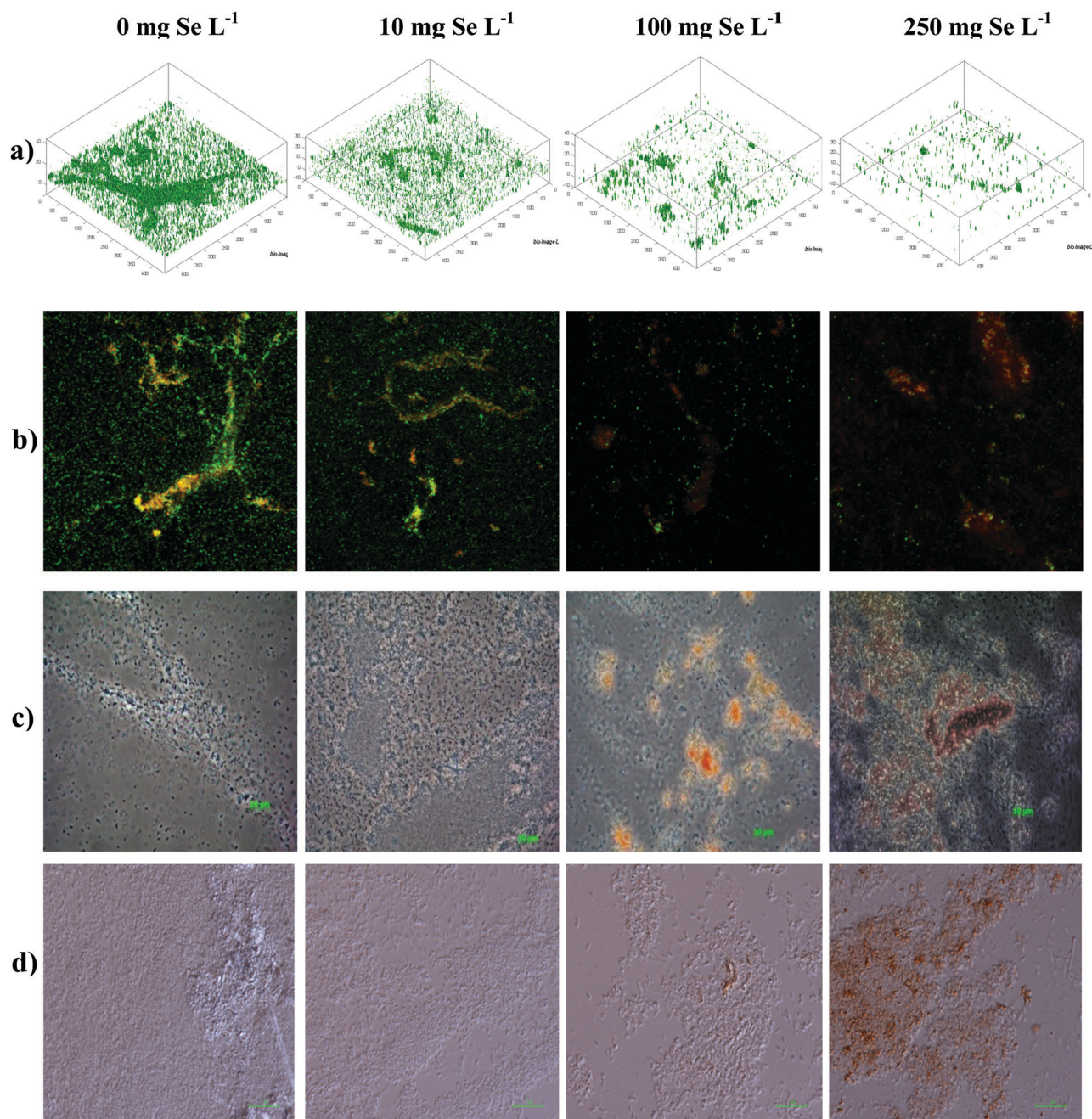


Fig. 5 (a) 3D distribution of the analysed biofilm population obtained from one of the confocal z-stacks using biolmageL software, (b) examples of different CLSM images composing a stack (different sections of a biofilm population). Bacteria with intact cell membranes are stained fluorescent green whereas bacteria with damaged membranes are stained fluorescent red; (c) phase contrast-microscopy microphotographs and (d) differential interference contrast microscopy images. All of them correspond to *P. aeruginosa* biofilms developed in the presence of different concentrations of SeNPs after 24 h of exposure.

to the reduction of the biovolume, the cell area coverage (and therefore the percentage of cells) suffered also a great diminution which evidenced less effectiveness in the surface colonization and distortion in the biofilm architecture (Table 1).

The images provided by PC and DIC microscopy (Fig. 5c and d) showed a heterogeneous biofilm structure similar to that previously detected by CLSM. The bacterial biofilm seems to be continuous and heterogeneous on the untreated glass slide.

In contrast, the presence of SeNPs resulted in a significant structural distortion of the biofilm architecture where nanoparticles seemed to be attached to the biofilm surface as revealed by the distinctive red colour of the SeNPs.

Similar images were acquired from *P. aeruginosa* biofilms treated with different concentrations of TeNPs (1, 25 and 125 mg Te L⁻¹). Once again, the CLSM micrographs (Fig. 6a and b) showed a highly heterogeneous biofilm with bacterial

Table 1 Analysis of biofilms developed by *P. aeruginosa* in the presence and absence of SeNPs. Data were calculated from the images obtained by CLSM with biolmage_L software

SeNPs (mg Se L ⁻¹)	Substratum area (μm ²)	Cell area coverage (μm ²)	Coverage (%)	Biovolume (μm ³)	Biovolume reduction (%)	Viable cell biovolume (%)
0	775 809	34 886	4	294 487	—	95
10	775 809	21 055	3	80 864	70	90
100	775 809	17 372	2	68 716	80	100
250	775 809	10 490	1	6937	98	99

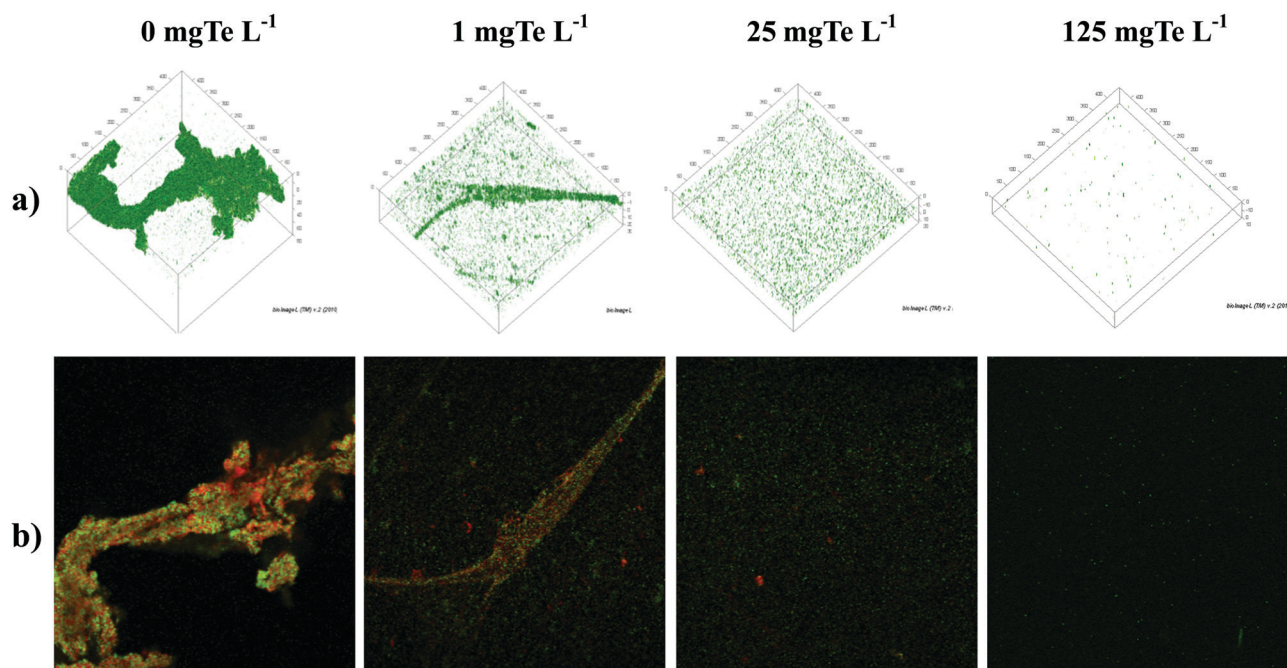


Fig. 6 (a) 3D distribution of the analysed biofilm population obtained from one of the confocal z-stacks using biolmageL software and (b) examples of CLSM images composing a stack (different sections of a biofilm population). Bacteria with intact cell membranes are stained fluorescent green whereas bacteria with damaged membranes are stained fluorescent red. All of them correspond to *P. aeruginosa* biofilms developed in the presence of different concentrations of TeNPs after 24 h of exposure.

cells attached around the network structure of the EPS at the lowest concentration of TeNPs. However, the microbial structure of the *P. aeruginosa* biofilm was visible altered when the concentration of TeNPs increased, forming a heterogeneous structure containing separate microaggregates. These changes in the 3D biofilm structure were accompanied by a biovolume reduction up to 97% at 125 mg Te L⁻¹ (Table 2). While in the case of SeNPs the percentage of viable cells remained constant, the presence of TeNPs produced losses in cell viability (Table 2). The reduction in the biovolume was also accompanied by a reduction in the cell area coverage. Phase contrast and DIC images obtained from experiments carried out with TeNPs were not included in the manuscript. The white colour of TeNPs makes it difficult to determine the location of the nanoparticles as it was the case for the red SeNPs (Fig. 5c and d).

Regarding the results related to both nanoparticles, it is worth highlighting that the application of imaging techniques allowed us to directly observe SeNP and TeNP activity within the bacterial biofilm structure and hypothesize about the mechanism of the antimicrobial of both types of nanoparticles.

The proposed path may consist of three consecutive steps: transport of NPs to the confines of the biofilm, attachment to the surface and finally migration within the biofilm. These results are in agreement with the experimental observation made by other authors when using other types of nanoparticles.³²

Finally, it is worth mentioning that different values of biofilm inhibition were provided by the CLSM and colorimetric methods. The differences can be attributed to the different information provided by both techniques. The crystal violet assay allows quantifying the biofilm biomass through the staining of the whole microbial population as well as other components present in the biofilm matrix. Although it is one of the most common methods for evaluating microbial biofilms, it presents some drawbacks mainly associated with the washing step employed for removing unattached cells that may lead to poor reproducibility of the results and erroneous conclusions. CLSM allows obtaining three-dimensional examination of the biofilm and information on structural parameters such as the biofilm biovolume as well as the spatial distribution of viable and non-viable bacteria within the confines of a biofilm.³³

Table 2 Analysis of biofilms formed by *P. aeruginosa* in the presence and absence of TeNPs. Data were calculated from the images obtained by CLSM with biolmage_L software

TeNPs (mg Te L ⁻¹)	Substratum area (μm ²)	Cell area coverage (μm ²)	Coverage (%)	Biovolume (μm ³)	Biovolume reduction (%)	Viable cell biovolume (%)
0	973 640	34 345	4	148 361	—	83
1	973 640	35 345	4	123 177	17	85
25	973 640	33 894	4	112 533	30	70
125	973 640	2887	1	3619	97	79

Otherwise, when nanoparticles are involved in crystal violet assays, erroneous results could be obtained. Thuptimtang *et al.* (2017) reported differences in biomass results from crystal violet staining experiments and CLSM measurements when AgNPs were tested as an antibiofilm agent. The variations in the results were attributed to the ability of the dye to stain all biofilm components including EPS and live and dead cells whereas the physical characteristics calculated by imaging software programs are exclusively based on 3D images of cell populations.³⁴ Additionally, nanoparticles can interact with either the EPS of the biofilm matrix or with the microplate surface producing non-specific staining, which may contribute to inaccurate conclusions.

4. Conclusions

The results presented in this work suggest that metalloid nanoparticles such as SeNPs and TeNPs disturb the QS signalling system and hence bacteria–bacteria communication. It has been shown that these nanoparticles produce inhibition of QS-mediated violacein synthesis in *C. violaceum* and biofilm formation in *P. aeruginosa*. SeNPs greatly affect the violacein production (80%) in *C. violaceum* strain ATCC 12472 suggesting the interruption of QS signal biosynthesis by nanoparticles whereas TeNPs might mostly affect processes related to the signal perception and response. So, nanoparticles seem to disturb QS processes depending on their characteristics. Furthermore, results from colorimetric assays showed that SeNPs nanoparticles are more effective at inhibiting biofilm formation than removing pre-established biofilms, which is in agreement with the ability of SeNPs to interrupt the bacterial signalling needed for developing biofilms. In the case of TeNPs, a lower concentration was required to cause similar inhibition values in a *P. aeruginosa* biofilm. Finally, a variety of imaging techniques along with bioinformatics tools have allowed the evaluation of the mechanism by which SeNPs and TeNPs could behave as antibiofilm agents. Digital image processing of CLSM and microscopy techniques have shown that both nanoparticles produce a severe distortion in the biofilm structure developed by *P. aeruginosa*. The alteration of the organized structure of the biofilm may influence the biofilm antibiotic tolerance, thus reducing antibiotic resistance. Data from performing architectural metric calculations evidenced that decreases of biofilm structure stability are associated with a biovolume reduction.

The present study provides for the first time information on the mechanisms by which metalloid nanoparticles disturb

bacterial QS communication and population behaviour. The results obtained open new approaches to fight against bacterial persistent infections, multidrug resistance or any other QS-related process of medical, biotechnological or environmental concern.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2017-83569-C2-1-R and CTM2016-76491-P) and the Comunidad of Madrid and European funding from FSE and FEDER programs (project S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM). We also thank the Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre (Complutense University of Madrid) for technical assistance.

References

- 1 T. Defoirt, Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy, *Trends Microbiol.*, 2018, **26**(4), 313–328.
- 2 M. Whiteley, S. P. Diggle and E. P. Greenberg, Bacterial quorum sensing: the progress and promise of an emerging research area, *Nature*, 2017, **551**(7680), 313–320.
- 3 N. B. Turan, D. S. Chormey, C. Buyukpinar, G. O. Engin and S. Bakirdere, Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination, *Trends Anal. Chem.*, 2017, **91**, 1–11.
- 4 T. R. Garrett, M. Bhakoo and Z. Zhang, Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Prog. Nat. Sci.*, 2008, **18**, 1049–1056.
- 5 A. Kumar, A. Alam, M. Rani, N. Z. Ehtesham and S. E. Hasnain, Biofilms: survival and defence strategy for pathogens, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2017, **307**(8), 481–489.
- 6 N. Hoiby, O. Ciofu, H. K. Johansen, Z. Song, C. Moser, P. O. Jensen, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen and T. Bjarnsholt, The clinical impact of bacterial biofilms, *Int. J. Oral Sci.*, 2011, **3**, 55–65.
- 7 V. C. Kalia, S. K. S. Patel, C. Kang and J. K. Lee, Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.*, 2019, **37**(1), 68–90.
- 8 A. Raghunath and E. Perumal, Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2017, **49**(29), 137–152.

- 9 Y. N. Slavin, J. Asnis, U. O. Häfeli and H. Bach, Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind anti-bacterial activity, *J. Nanobiotechnol.*, 2017, **15**, 1–65.
- 10 L. Wang, C. Hu and L. Shao, The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **12**, 1227–1249.
- 11 S. Chhabria and K. Desai, Selenium nanoparticles and their applications, in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, ed. H. Nalwa, American Scientific Publishers, 2016, pp. 1–32.
- 12 L. A. Ba, M. Döring, V. Jamier and C. Jacob, Tellurium: and element with great biological potency and potential, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4203–4216.
- 13 R. J. Turner, R. Borghese and D. Zannoni, Microbial processing of tellurium as a tool in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, 2012, **30**, 954–963.
- 14 M. Stozoff, S. Q. Wang and J. Webster, *Efficacy and mechanism of selenium nanoparticles as antibacterial agents*, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2016, Conference Abstract: 10th World of Biomaterial Congress.
- 15 G. Khiralla and B. El-Deeb, Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens, *LWT Food Sci. Technol.*, 2014, **63**(2), 1001–1007.
- 16 M. Shakibaie, H. Forootanfar, Y. Golkari, T. Mohammadi-Khorsand and M. J. Shakibaie, Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, **29**, 235–241.
- 17 X. Huang, X. Chen, Q. Chen, Q. Yu, D. Sun and J. Liu, Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs, *Acta Biomater.*, 2016, **30**, 397–407.
- 18 E. Cremonini, M. Boaretti, I. Vandecandelaere, E. Zonaro, T. Coenye, M. LLeo, S. Lampis and G. Vallini, Biogenic selenium nanoparticles synthesized by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02 loose antibacterial and antibiofilm efficacy as a result of the progressive alteration of their organic coating layer, *Microb. Biotechnol.*, 2018, **11**, 1037–1047.
- 19 B. Zare, M. A. Faramarzi, Z. Sepehrizadeh, M. Shakibaie, S. Rezaie and A. R. Shahverdi, Biosynthesis and recovery of rod shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities, *Mater. Res. Bull.*, 2012, **47**, 3719–3725.
- 20 E. Zonaro, S. Lampis, R. J. Turner, S. J. S. Qazi and G. Vallini, Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms, *Front. Microbiol.*, 2015, **6**, 584.
- 21 D. C. Vaigankar, S. K. Dubey, S. Y. Mujawar, A. Costa and S. K. Shyama, Tellurite biotransformation and detoxification by *Shewanella baltica* with simultaneous synthesis of tellurium nanorods exhibiting photo-catalytic and anti-biofilm activity, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2018, **165**, 516–526.
- 22 M. Palomo-Siguero and Y. Madrid, Exploring the behavior and metabolic transformations of SeNPs in exposed lactic acid bacteria. Effect of nanoparticles coating agent, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(8), 1712.
- 23 M. S. Wagh, R. H. Patil, D. K. Thombre, M. V. Kulkarni, W. N. Gade and B. B. Kale, Evaluation of anti-quorum sensing activity of silver nanowires, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97**, 3593–3601.
- 24 K. Naik and M. Kowshik, Anti-quorum sensing activity of AgCl–TiO₂ nanoparticles with potential use as active food packaging material, *J. Appl. Microbiol.*, 2014, **117**(4), 972–983.
- 25 B. R. Singh, B. N. Singh, A. Singh, W. Khan, A. Naqvi and H. B. Singh, Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 13719.
- 26 N. A. Al-Shabib, F. M. Husain, F. Ahmed, R. A. Khan, I. Ahmad, E. Alsharaeh, M. S. Khan, A. Hussain, M. T. Rehman, M. Yusuf, I. Hassan, J. M. Khan, G. M. Ashraf, A. Alsalmeh, M. F. Al-Ajmi, V. V. Tarasov and G. Aliev, Biogenic synthesis of zinc oxide nanostructures from *Nigella sativa* seed: prospective role as food packaging material inhibiting broad-spectrum quorum sensing and biofilm, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 36761.
- 27 J. H. Merritt, D. E. Kadouri and G. A. O'Toole, Growing and analyzing static biofilms, *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2011, **1**, 1–18.
- 28 L. E. Chavez de Paz, Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75**, 1734–1739.
- 29 C. Grandclement, M. Tannieres, S. Morera, Y. Dessaux and D. Faure, Quorum quenching: role in nature and applied developments, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2016, **40**, 86–116.
- 30 A. K. Sinha, A. K. Sasmal, S. K. Mehetor, M. Pradhan and T. Pal, Evolution of amorphous selenium nanoballs in silicone oil and their solvent induced morphological transformation, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 15733–15736.
- 31 B. Gates, B. Mayers, B. Cattle and Y. Xia, Synthesis and characterization of uniform nanowires of trigonal selenium, *Adv. Funct. Mater.*, 2002, **12**(3), 219–227.
- 32 K. Ikuma, A. W. Decho and B. L. T. Lau, When nanoparticles meet biofilms – interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles, *Front. Microbiol.*, 2015, **6**, 1–6.
- 33 J. Azeredo, N. F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A. R. Costa, M. Desvaux, G. Di Bonaventura, M. Hébraud, Z. Jaglic, M. Kačaniová, S. Knöchel, A. Lourenço, F. Mergulhão, R. L. Meyer, G. Nychas, M. Simões, O. Tresse and C. Sternberg, Critical review on biofilm methods, *Crit. Rev. Microbiol.*, 2017, **43**, 313–351.
- 34 P. Thuptimrang, T. Limpiyakorn and E. Khan, Dependence of toxicity of silver nanoparticles on *Pseudomonas putida* biofilm structure, *Chemosphere*, 2017, **188**, 199–207.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

Aplicación de la técnica “single cell-ICP-MS” (SC-ICP-TQ-MS) para establecer perfiles de acumulación y biotransformación de TeNPs en células individuales de bacterias de interés en la industria alimentaria.

Los ensayos de acumulación de metales y metaloides, tanto en forma disuelta como particulada, por parte de poblaciones planctónicas de microorganismos, son esenciales para determinar el efecto biocida, interacción e impacto biológico de estos compuestos. La forma habitual de llevar a cabo estos experimentos implica una fase inicial de exposición de los cultivos bacterianos a los elementos traza o nanopartículas, seguida por la digestión ácida del pellet bacteriano, y posterior media del contenido total del metal/metaloide mediante ICP-MS. De esta manera, se puede determinar el contenido total del elemento asimilado por una población celular y, conociendo el número de células que constituyen la población, se puede establecer el contenido medio del elemento por célula individual. Sin embargo, este procedimiento parte de la premisa de que todas las células que integran la población asimilan la misma cantidad de elemento y/o nanopartícula. Es decir, no tiene en cuenta la heterogeneidad de las poblaciones bacterianas, lo que puede derivar en resultados erróneos o en una pérdida de información. En este sentido, la cuantificación de dichos elementos en células individuales puede proporcionar información muy útil sobre los mecanismos empleados por los microorganismos para la acumulación de metales y metaloides tanto en forma disuelta como particulada.

Sin embargo, determinar la acumulación de metales, metaloides y nanopartículas en células individuales no es una tarea fácil, ya que requiere que las células bacterianas lleguen intactas al sistema de medida. En este sentido, la técnica ICP-MS en modo de detección de células individuales (SC-ICP-MS) permite estudiar los modelos de acumulación de células individuales de poblaciones planctónicas. El fundamento de la técnica es similar a la técnica de SP-ICP-MS, sin embargo requiere de la utilización de sistemas de introducción de muestra en el plasma que permitan que las células individuales lleguen intactas al plasma para poder así cuantificar con precisión el perfil de asimilación.

En el trabajo presentado en este capítulo (Artículo 8) y que lleva por título **“Single-cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate bacterial uptake and morphological changes of tellurium nanoparticles”**, se propone el empleo de SC/SP-ICP-MS junto con la difracción de rayos-X y la microscopía electrónica de transmisión para evaluar la acumulación, localización y transformación de las nanopartículas de telurio (TeNPs) por las poblaciones bacterianas planctónicas de *S. aureus* y *E. coli* a nivel de células individuales. La técnica SC-ICP-MS permitió la determinación de parámetros tan importantes para establecer los perfiles de acumulación como la masa total de telurio y el número de partículas acumulada por cada célula en ambos cultivos bacterianos. Asimismo, las observaciones realizadas mediante TEM evidenciaron que una vez acumuladas por las bacterias, las TeNPs se localizan tanto en el interior celular como adheridas a la superficie de la membrana. Además, las imágenes de TEM confirmaron lo previamente observado en relación a las transformaciones morfológicas que sufren las TeNPs. Estas, que inicialmente presentaban una morfología esférica, adquirieron forma de nanovarillas como consecuencia de su interacción con las bacterias. Adicionalmente, se llevó a cabo la caracterización dimensional de estas nanovarillas. Sin embargo, el hecho de que estas partículas no fueran esféricas dificultó enormemente su caracterización. Para la determinación de las dimensiones (altura y anchura) de las nanovarillas, se optimizó un esquema experimental consistente en el aislamiento previo de las nanovarillas asociadas a bacterias mediante un proceso de disrupción de las células bacterianas, seguido del análisis de las nanovarillas aisladas por TEM y SP-ICP-MS. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que permitieron determinar las dimensiones de las nanovarillas, lo que evidencia la gran utilidad de la combinación de las técnicas de SP-ICP-MS y TEM para la caracterización de nanopartículas que se alejan de la esfericidad. Hasta la fecha la técnica SP-ICP-MS se había aplicado casi exclusivamente para el estudio de nanopartículas esféricas. Por otro lado, cabe destacar que en este trabajo se ha aplicado por primera vez la técnica SC-ICP-MS para investigar los perfiles de acumulación de las nanopartículas en células individuales de poblaciones bacterianas.

ARTÍCULO 8

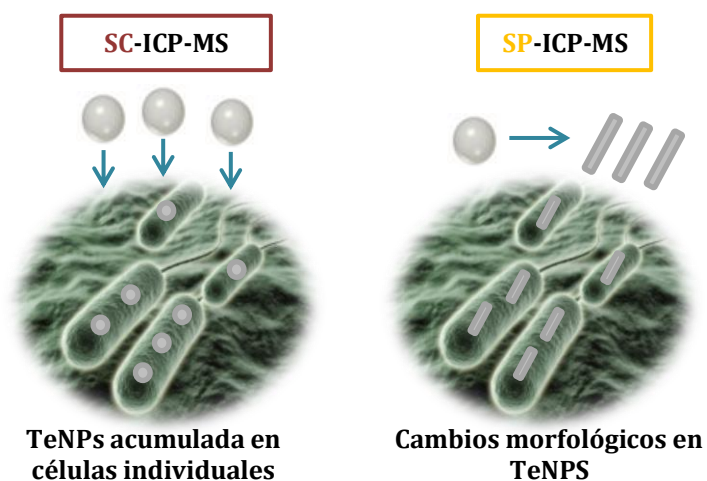
Análisis por ICP-MS en modo de detección de células individuales y partículas individuales (SC/SP-ICP-TQ-MS) para evaluar cuantitativamente la asimilación de nanopartículas de telurio (TeNPs) en poblaciones bacterianas modelo y los cambios morfológicos como consecuencia de la interacción bacteria-nanopartícula.

Single-cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate bacterial uptake and morphological changes of tellurium nanoparticles.

Gómez-Gómez, B., Corte-Rodriguez, M., Pérez-Corona, M.T., Bettmer, J., Montes-Bayon, M., Madrid, Y.

Anal. Chem. (Enviado)

ACUMULACIÓN Y BIOTRANSFORMACIÓN DE TeNPS EN CÉLULAS INDIVIDUALES DE BACTERIAS MODELO



This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Single cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate bacterial uptake and morphological changes of tellurium nanoparticles

Journal:	<i>Analytical Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gomez-Gomez, Beatriz; Universidad Complutense de Madrid, Quimica Analitica Corte-Rodríguez, Mario; Universidad de Oviedo, Departamento de Química Física y Analítica Pérez- Corona, Maria Teresa; Universidad Complutense de Madrid, Quimica Analitica Bettmer, Jorg; Universidad de Oviedo, Departamento de Química Física y Analítica Montes-Bayon, Maria; Universidad de Oviedo, Physical and Analytical Chemistry Madrid, Yolanda; Universidad Complutense de Madrid, Quimica Analitica

SCHOLARONE™
Manuscripts

**Single cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to
quantitatively evaluate bacterial uptake and morphological
changes of tellurium nanoparticles**

Beatriz Gomez-Gomez¹, Mario Corte-Rodríguez², M^a Teresa Perez-Corona¹, Jörg
Bettmer², María Montes-Bayón², Yolanda Madrid^{1,*}

¹ Complutense University of Madrid, Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of
Chemistry. Avda. Complutense s/n 28040, Madrid. Spain

² University of Oviedo, Dept. of Physical and Analytical Chemistry, C/ Julián Clavería 8,
E-33006 Oviedo, Spain.

*Corresponding Author:

Prof. Yolanda Madrid Albarran
Dept. of Analytical Chemistry
Faculty of Chemistry
Universidad Complutense de Madrid
E-28040 Madrid, Spain
Phone: +34913945145
Fax: +34913944329
e-mail: ymadrid@ucm.es

Abstract

Assessing the impact of nanoparticles in living systems implies a proper evaluation of their behaviour at single-cell level. Due to the small size of nanoparticles, their accumulation, transformation and location within single cells is challenging. In this work, the combination of single cell/single particle (SC/SP)-ICP-TQ-MS analysis along with X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM) measurements has allowed us to go deeper into the interaction between tellurium nanoparticles (TeNPs) and two bacterial model organisms, *S. aureus* and *E. coli*. The use of single cell-ICP-TQ-MS enabled the individual introduction of bacterial cells where tellurium and phosphorous as constitutive element were monitored. Complementary, single cell-ICP-MS analysis permitted the detection of TeNPs in individual bacterial cells at concentration levels down to femtogram per cell. Such findings were possible thanks to the use of a high performance concentric nebulizer combined with a total consumption spray chamber that provided bacterial cell transmission efficiency as high as 60%. X-Ray analysis measurements confirmed also the occurrence of compositional and morphological changes (from nanospheres to nanorods) as nanoparticles interact with both bacterial strains. Finally, quantitative SP-ICP-MS analysis after carrying out cell lysis was applied to determine the number of particles per bacteria cell and to perform the dimensional characterization of the rod-shaped TeNPs associated to *S. aureus* and *E. coli*. To the best of our knowledge, this is the first time that the dimensions (width and length) of TeNPs nanorods have been estimated by employing both, SP-ICP-MS and TEM measurements.

Keywords: single cell ICP-MS; single particle ICP-MS; Tellurium nanoparticles; nanospheres; nanorods; *S. aureus*; *E. coli*.

Metal/metalloid-based nanoparticles are present in our daily life (personal care and food products and textiles) and even in the biomedical field due to their potential as antimicrobial and drug delivery agents^{1, 2, 3, 4, 5}. Unfortunately, the release of nanomaterials into the environment is nowadays a matter of concern. To elucidate the impact of nanoparticles on ecosystems and human health a proper evaluation about nanoparticle behaviour at single-cell level⁶ is needed. Most of the reported studies on this topic estimate average contents of nanoparticle uptake in the entire cell population by performing classical bulk analysis of a large amount of cells after dissolution^{7, 8}. As a matter of fact, this approach does not provide information on cell to cell variability. Quantifying metal/metalloid based nanoparticles accumulation at single cell level is not an easy task due to both, the lack of appropriate methodologies and the difficulties found when performing cell lysis⁹. Nanoparticles uptake studies at single cell level become even more complicated when nanoparticles transformations in biological media take place¹⁰.

Recently, tellurium based nanoparticles (TeNPs) have been proposed to be introduced in various industrial fields including the production of solar panels, glasses, new-generation rechargeable batteries and electronic devices, and also to environmental remediation and biomedical applications^{11, 12, 13, 14, 15, 16, 17}.

Lately, ICP-MS-based analytical techniques for nanoparticles and cells determination such as single-particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS), respectively, have emerged as powerful techniques for quantitatively assessing the impact of nanoparticles in living systems. SP-ICP-MS has been widely employed for sizing and quantifying nanoparticles in terms of number of nanoparticles in a wide range of matrices including consumer products, medical devices, biological tissues and environmental samples^{18, 19, 20, 21, 22}. SC-ICP-MS follows a similar principle than SP-ICP-MS and is used to detect and quantify the metal content within individual cells²³. In this approach, cells are directly nebulized (nowadays often using micro-flow

nebulizers²⁴) or micro-droplets dispensed into the plasma²⁵. In order to be successful in this type of analysis, it is crucial to obtain diluted cell suspensions and to introduce them into the plasma in the most efficient manner. For the latter purpose, special sample introduction systems are continuously being developed and improved by combining different micro-flow nebulizers with total consumption spray chambers^{24, 26, 27}. SC-ICP-MS has been successfully applied to evaluate the uptake of trace elements and metal-based nanoparticles by single human, algae or yeast cells^{28, 29, 30, 31}. However, its application to bacteria has been scarce^{23,32}

Although, the robustness of SP-ICP-MS has been demonstrated, limitations arise when nanoparticles are far from having a spherical morphology. This limitation implies a serious problem when evaluating the behaviour of nanoparticles in living systems, as nanoparticles may undergo morphological changes³³.

Therefore, in this work we aim to study the fate and uptake of tellurium based nanoparticles (TeNPs) in two bacterial model organisms, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, by combining single cell and single particle ICP-TQ-MS along with electron microscopy and X-ray diffraction. The work has been divided into three parts: 1) nanoparticle characterization before and after being added to bacterial culture by X-ray diffraction and transmission electron microscopy measurements in order to investigate morphological and compositional changes that nanoparticles may suffer as consequence of their interaction with bacteria, 2) quantification of accumulated TeNPs in individual bacterial cells at different exposure levels by performing SC-ICP-MS analysis, and 3) dimensional characterization of tellurium nanorods formed thorough the interaction of bacteria with the originally spherical TeNPs by employing TEM and SP-TQ-ICP-MS measurements. To the best of our knowledge, this is the first time that SC-ICP-MS and SP-ICP-MS along with TEM and X-ray analysis have been applied to investigate nanoparticle uptake in bacterial cells and to estimate the dimensions of TeNPs nanorods.

Experimental

Synthesis and characterization of tellurium nanoparticles (TeNPs)

Tellurium nanoparticles (TeNPs) were synthesized following the procedure previously reported by Gómez-Gómez et al.³³ TeNPs were fully characterized in terms of size, morphology and composition by using TEM, energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) and X-ray diffraction pattern measurements. TeNPs synthesis and characterization is described in the Experimental section of Supporting Information.

Bacteria culture conditions and exposure to TeNPs

S. aureus (ATCC 29213) and *E. coli* (ATCC 25922) were cultured in Luria-Bertani (LB) medium and grown overnight at 37°C under stirring (120 rpm). The obtained bacterial suspensions were diluted with LB solution until reaching an optical density (OD) of 0.1 at 620 nm. Then, bacterial cells were exposed to 0.5, 1 and 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs during 18h at 37°C and 120 rpm. Non-incubated bacterial cells (control) were also treated in the same way. Finally, tellurium concentration in the microwave digested pellet HNO₃/H₂O₂ (3:1) was measured by the triple quadrupole based Thermo iCAP TQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) using the single quadrupole mode.

TeNPs internalization in bacteria by transmission electron microscopy (TEM)

Bacterial cells exposed to different concentrations of TeNPs were harvested and prepared for TEM observation through a process including fixation, dehydration, and embedding in a resin matrix by means of using and p-formaldehyde (4% v/v) and osmium tetroxide (1% v/v) as indicated in the Experimental section of Supporting Information.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry measurements in bacteria cell suspensions in presence and absence of nanoparticles were performed to determine the percentage of viable and non-viable cells and to establish the number of bacterial cells with the aim of calculating the transport efficiency of the sample introduction system. The procedure to perform flow cytometry analysis is described in the Experimental section of Supporting Information.

Single cell analysis by ICP-TQ-MS

Bacterial cell suspensions obtained from the exposure experiments described in the previous section were washed three times with TBS and diluted with Milli-Q water to get a cell number concentration of approximately 10^5 cells mL⁻¹. Single-cell analysis was performed by using the ICAP TQ ICP-MS equipped with a high performance concentric nebulizer (HPCN) combined with the total consumption spray chamber (High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS, Glass Expansion, Port Melbourne, Australia). Samples and rinsing solutions were introduced into the plasma at a flow rate of 10 μ L min⁻¹ using the MVX-7100 μ L Workstation (Teledyne CETAC Technologies, Omaha, NE, USA). Instrumental and data acquisition parameters are listed in Table S1. Measurements were carried out under time resolved analysis mode during 2 min per analysis with a dwell time of 5 ms and by selecting ¹²⁶Te as monitoring isotope. Furthermore, constitutive phosphorous chosen as constitutive cell element was measured as oxide (³¹P¹⁶O⁺) in the triple quadrupole mode by using oxygen as reaction gas in a separate run. Transport efficiency of calibration standards was calculated by analysing citrate stabilized gold nanoparticle (AuNPs, nominal diameter 30 nm) standard (RM 8012) obtained from the NIST (Gaithersburg, MD, USA). Moreover, CyTOF Calibration Beads (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA) containing europium at a particle number concentration of 33000 L⁻¹ (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA) were also employed to determine daily cell transport efficiency³⁴. In order to perform Te mass quantification by

SP-ICP-MS analysis, a calibration curve of ionic tellurium was prepared daily within a concentration range from 0 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ with a tellurium standard for ICP obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Data treatment of SC-ICP-MS analysis was carried out by applying an iterative procedure previously reported²⁶. Information on data treatment of SC-ICP-MS analysis and validation of the results is included in the Experimental section of Supporting information.

Bacteria cell disruption and single-particle ICP-MS (SP-ICP-MS) analysis of cell lysates

Bacterial cells were disrupted mechanically by using 0.5 mm glass beads (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). 1 mL of bacterial cell suspensions was mixed with 734 mg of 500 μm diameter glass beads in an Eppendorf tube. Afterwards, the mixture was submitted to 5 min Vortex agitation followed by 10 min of sonication by means of an ultrasonic bath. The procedure was repeated twice for *E. coli*, but up to six cycles were needed to disrupt the *S. aureus* cells. Subsequently, cell debris and unbroken bacteria cells were removed appropriately by applying a centrifugation step at 2,000 g for 2 min. Particle mass quantification of TeNPs inside bacteria cells or adhered to bacterial membrane after bacterial cell disruption was performed by SP-ICP-MS and by applying the same procedure as for SC-ICP-TQ-MS analysis (as described above).

Results and discussion

TeNPs accumulation by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Morphological and compositional transformation.

The synthesis of the TeNPs resulted in spherical particles with a diameter of (125 ± 40) nm consisting of 80 % TeO_2 and 20 % Te. A detailed characterization of the synthesized TeNPs is summarized in the Supporting Information (Figure S1).

The uptake of TeNPs by *S. aureus* and *E. coli* was assessed after their exposure to 0.5, 1 and 15 mg Te L^{-1} as TeNPs during 18h at 37°C. The amount of Te accumulated

was calculated by acid digestion of the bacterial pellet followed by ICP-TQ-MS analysis in single quad mode. The highest accumulation percentages were found for *S. aureus* reaching nearly 100 % for all TeNPs levels of exposure, whereas the accumulation percentages in *E. coli* varied between 28% and 48% depending on the TeNPs concentration administered to the bacterial culture.

According to Flow cytometry measurements, around 90% of bacterial cells were viable in case of *S. aureus* and *E. coli* independent from the amount of supplemented TeNPs.

It is important to notice that a change in the colour of the culture medium, - from almost colourless to deep black - was observed when the highest concentration of TeNPs was supplemented to both bacterial strains. In contrast, no variation in the culture medium colour was observed when TeNPs were dispersed in LB medium in absence of bacteria. The observed colour changes were associated with the appearance of tellurium nanorods as shown in Figures 1a and b.

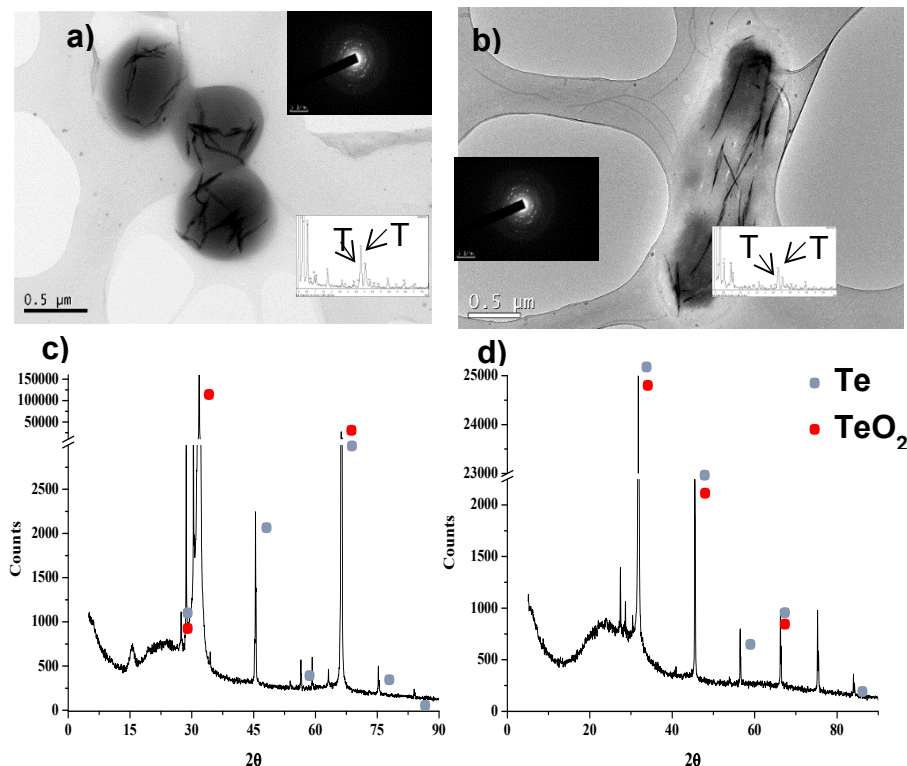


Figure 1: TEM images, EDXS spectra and concentrating ring (a, b) and X-ray diffraction pattern (c, d) of rod-shaped TeNPs found in (a, c) *S. aureus* and (b, d) *E. coli* experiments.

The presence of tellurium nanorods was only detected in presence of 15 mg L^{-1} , but not at 0.5 and 1 mg Te L^{-1} levels. This fact can be explained as 0.5 and 1 mg Te L^{-1} was a very low Te levels to be observed by TEM. The electron diffraction pattern composed by concentric rings presented in TEM images (Figures 1a and b) confirmed the crystalline structure of the rod-shape tellurium nanoparticles. The morphological change observed (from spherical to nanorod shape) can be linked to a detoxification mechanism as it has been also reported for SeNPs and TeNPs in different bacteria strains^{35, 36, 37, 38, 39}. To the best of our knowledge, the morphological transformation of TeNPs from spheres to nanorods after being exposed to *S. aureus* and *E. coli* has not been reported to date.

Size of rod-shape tellurium nanoparticles was determined by counting more than 200 individual particles from different TEM images and by employing the Image J software. It was found that the length and width of Te nanorods in *E. coli* experiments were $(303 \pm 23) \text{ nm}$ and $(26 \pm 10) \text{ nm}$, respectively, with a length-to-width ratio of around 12. The respective data for *S. aureus* were $(267 \pm 129) \text{ nm}$ and $(21 \pm 8) \text{ nm}$ with a length-to-width ratio of around 14.

Additionally, the phase and composition of tellurium nanorods was also determined by X-ray diffraction Figures 1c and 1d display XRD spectra obtained from *S. aureus* and *E. coli* treated with TeNPs and XRD analysis confirmed that tellurium nanorods were composed of 99 % TeO_2 and 1 % Te. The results obtained clearly evidence important morphological and compositional changes in nanoparticles as they interact with bacterial cells. Nanoparticle adhesion to bacteria cell surface or internalization into bacteria cells are two of the most plausible mechanisms that may happen as consequence of the bacterial exposure to nanoparticles interaction. Unfortunately, TEM images were not clear enough to ensure whether nanoparticles were inside of bacteria cell or just attached to bacterial membranes. To correctly locate nanoparticles in relation to bacterial cells, TEM images of chemically fixed bacteria cells were acquired.

Figure 2 shows sectioned TEM images of *E. coli* and *S. aureus* in presence of 0, 1 and 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.

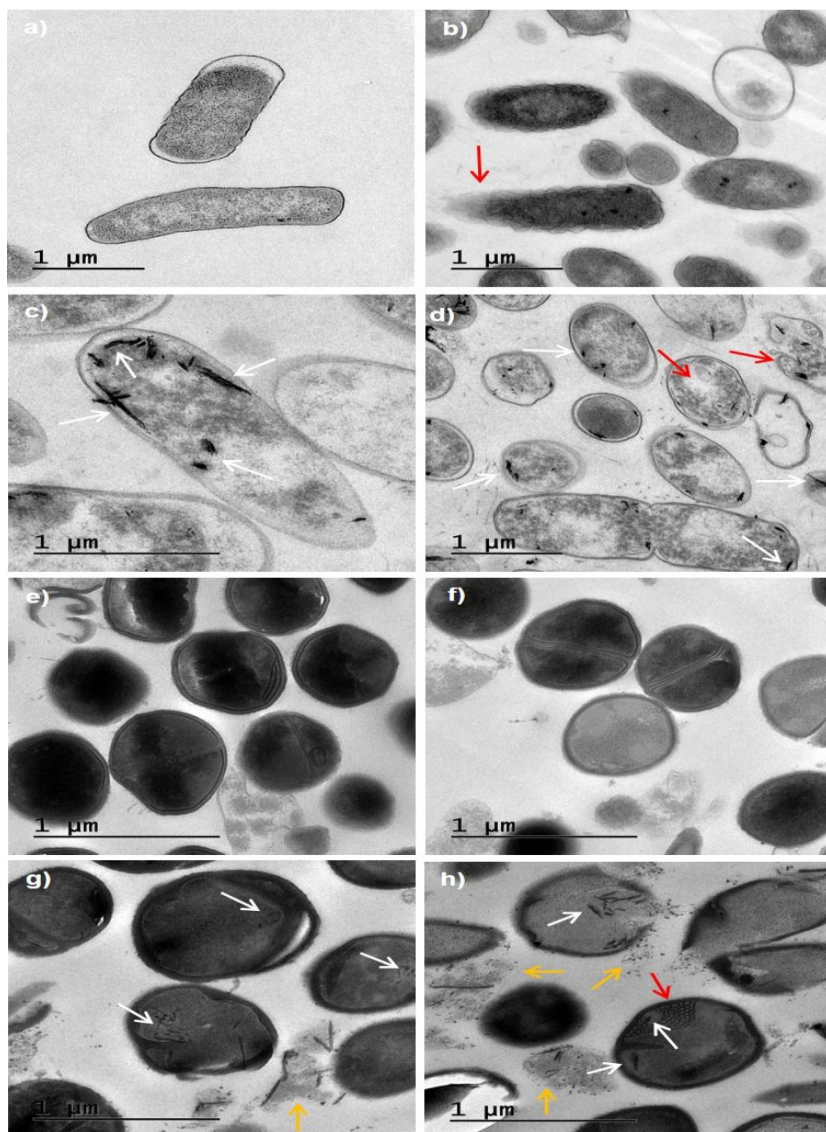


Figure 2: TEM images of a thin section of fixed *E. coli* treated with (a) 0, (b) 1, and (c and d) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs and *S. aureus* treated with (e) 0, (f) 1.0, and (g and h) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs. Red arrows indicate morphological changes in bacteria, white arrows the presence of rod-shaped TeNPs and yellow arrows membrane lysis.

In *E. coli* experiments, at 1 mg Te L⁻¹ as TeNPs, it is difficult to ensure the presence of nanoparticles inside the bacteria as the concentration of Te was very too low to be detected by TEM microscopy (Figure 2b). However, bacterial cell surface damage can be detected (Figure 2b) compared to the control cells (Figure 2a). Concerning to *E.coli*

treated with 15 mg Te L⁻¹, Te rod-shape nanoparticles could be found (highlighted with white arrows) either on the surface of the bacterial cell wall or inside the bacterial cell, (Figures 2c and d). Morphological changes in cell surface along with vesicles and ruffled extensions of the bacterial plasma membrane (red arrows) can be recognized. Endocytosis is one of the most likely mechanisms of nanoparticles internalization into cells⁴⁰. in the case of *S. aureus*, no particles attached to the bacteria membrane or inside the bacteria were observed at 1 mg Te L⁻¹ as TeNPs (Figure 2f). After incubation with 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs (Figure 2g) rod-shaped tellurium nanoparticles (white arrows) were present either associated to bacteria membrane or inside cells. Vesicles as consequence of an endocytosis process were also perceived (red arrows, Figure 2h) along with membrane deformation (yellow arrows, Figures 2g and h).

Quantitative analysis of TeNPs uptake at single cell level in bacteria

It is well known that metals and nanoparticles are heterogeneously distributed in cells. For this purpose in the current work, Single-cell ICP-MS was employed to perform TeNPs uptake profiling at single bacterial cell level. For this, a high performance concentric nebulizer with a total consumption spray chamber was employed. This combination enabled the introduction of intact bacteria into the plasma with a transport efficiency as high as 60 %. No statistically significant differences of transport efficiencies were found either for AuNPs (NIST 8012) or for 2.5 µm polystyrene CyTOF calibration beads loaded with europium as standard suspensions. To ensure that each individual ICP-MS signal corresponds to a single cell, the cell density was adjusted to approximately around 10⁵ cells per mL. Moreover, the efficiency of the cell introduction system was calculated by comparing data from the bacterial cell population, counted by flow cytometry, and the number of cell signals obtained for the constitutive element phosphorus (monitored as ³¹P¹⁶O⁺) in the single cell ICP-MS experiments⁴¹. Under optimal experimental conditions, the cell introduction efficiency was (74 ± 6) % and (85 ± 7) % for *E. coli* and *S. aureus*, respectively. Differences in the percentages of the

introduction efficiency might be attributed to bacterial cell size, $2.14 \pm 0.52 \mu\text{m}$ for *E.coli* and $0.74 \pm 0.12 \mu\text{m}$ for *S.aureus* (according to data from TEM micrographs). The amount of TeNPs (expressed as Te) at single-cell level was calculated by using an external calibration curve obtained with a tellurium standard solution followed by data processing as described in the supporting information. The limit of detection was found to be $(0.068 \pm 0.008) \text{ fg Te per cell}$. Figures 3a-d and 4a-d show time-resolved graphs

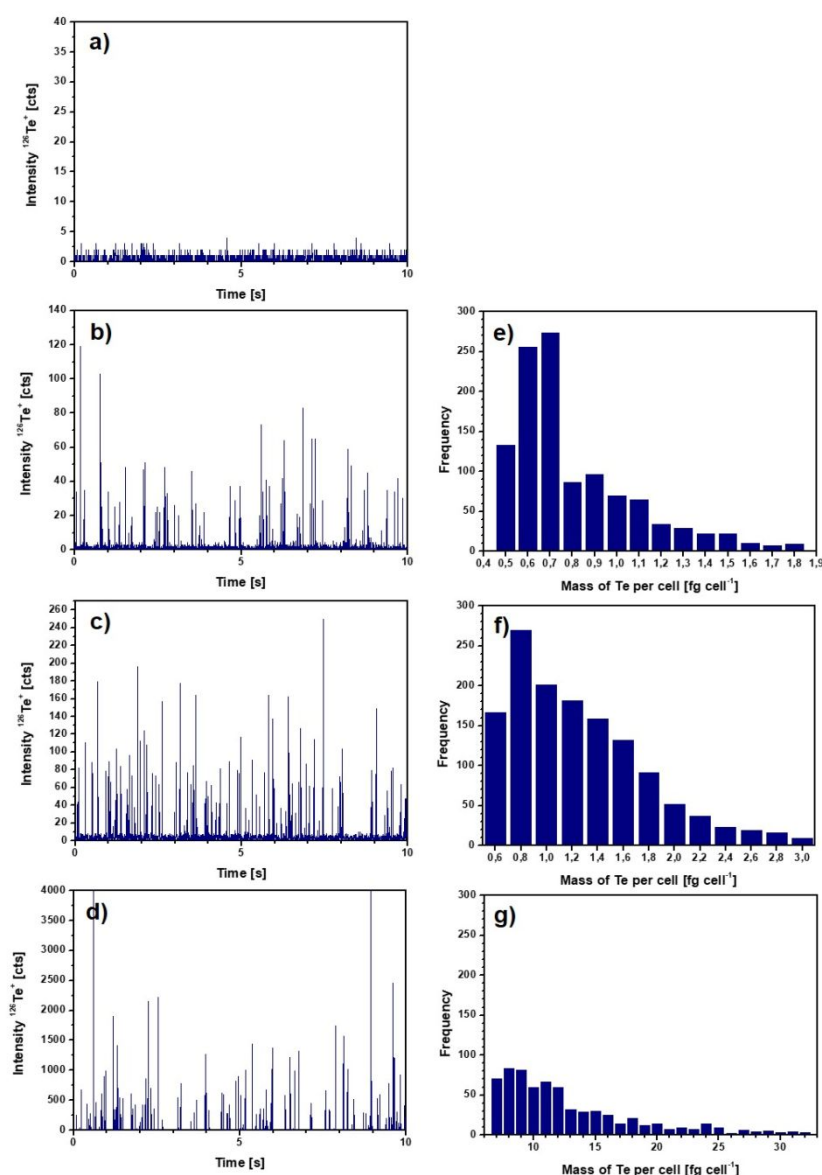


Figure 3: Time resolved SC-ICP-MS analyses of (a-d) ^{126}Te and the corresponding frequency histograms (e-g) for *S. aureus* cells treated with (a) 0, (b, e) 0.5, (c, f) 1, and (d, g) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.

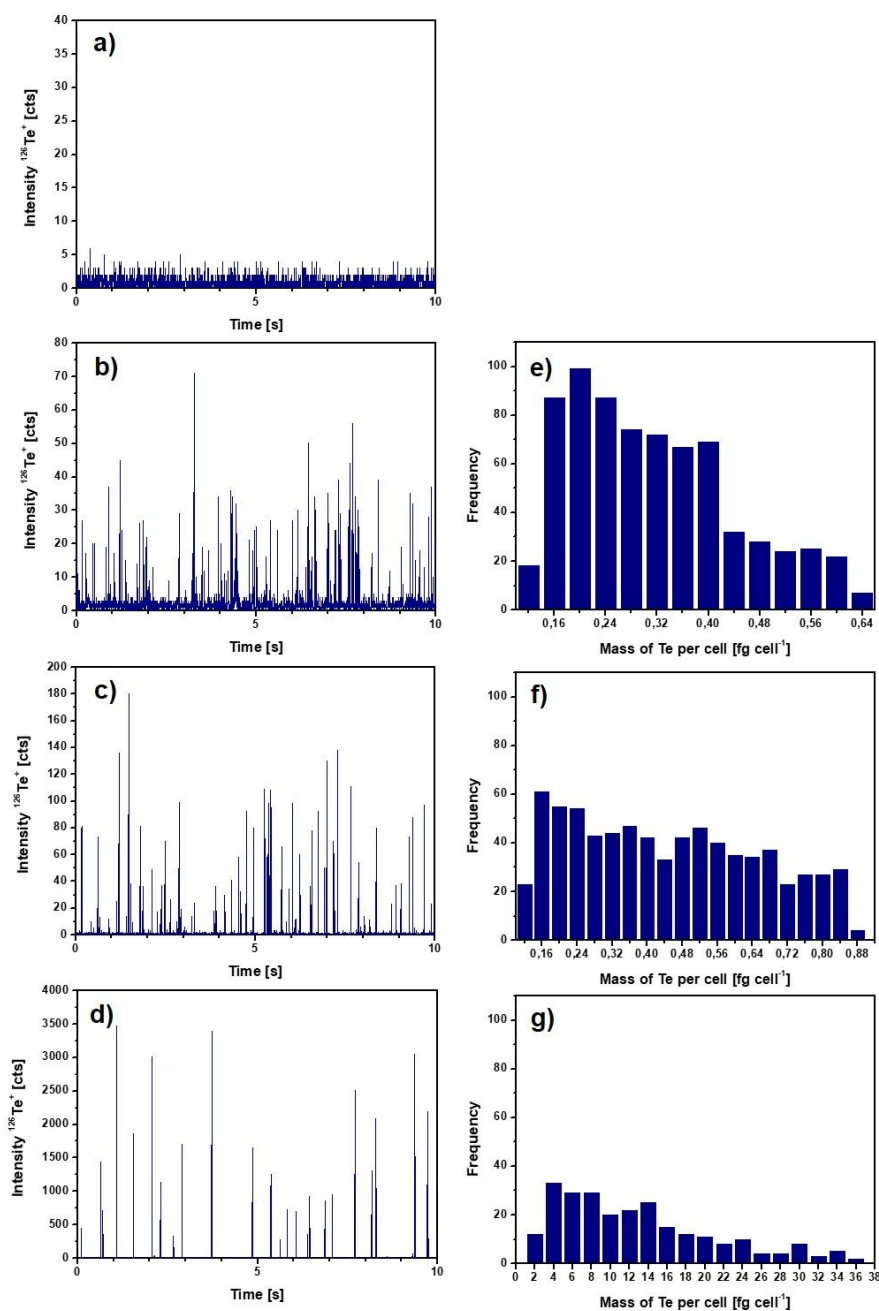


Figure 4: Time resolved SC-ICP-MS analyses of (a-d) ^{126}Te and the corresponding frequency histograms (e-g) for *E. coli* cells treated with (a) 0, (b, e) 0.5, (c, f) 1, and (d, g) 15 mg Te L^{-1} as TeNPs.

As shown in Figures S2 and S3, the number of phosphorus events decreased with increasing TeNPs concentrations from 2031 to 1503 for *S. aureus* and from 3643 to 427 for *E. coli*. The results show the influence of TeNPs on cell population density being more pronounced in the case of *E. coli*. On the contrary, the number and

intensity of Te spikes increases with rising TeNPs concentration (Figures 3b-d and 4b-d) whereas no spike signals were detected in the control samples (Figures 3a and 4a). Therefore, those spike signals that fulfil the criterion of being three times higher than the mean value of the background baseline were gathered and transformed into Te mass (fg) per single cell. Mass distribution histograms showing Te mass per individual cell (fg Te per cell) at each supplemented TeNPs concentration are displayed in Figures 3e-g and 4e-g for the two bacterial strains. As it was expected, the mass of TeNPs accumulated in individual bacterial is heterogeneously distributed for each experimental condition tested. Moreover, results from SC-ICP-TQ-MS analysis in single quad mode confirmed that TeNPs were either internalized or adsorbed onto the bacterial cell wall also at low levels of exposure such as 0.5 and 1 mg Te L⁻¹ as TeNPs. As it was previously mentioned, TEM did not enable to visualize the accumulation of TeNPs in bacteria population at these TeNPs levels of exposure. The average amount of Te per cell varied from (0.77 ± 0.22) fg per cell to (12.80 ± 5.58) fg cell for *S. aureus* and (0.30 ± 0.13) fg per cell to (12.43 ± 4.36) fg per cell for *E. coli* (Table 1)

Table 1: Te levels in *S. aureus* and *E. coli* after incubation with 0.5, 1, 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs by SC-ICP-MS and after acid digestion (mean ± SD; n=3).

[TeNPs] mg Te L ⁻¹	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	SC-ICP-MS fg cell ⁻¹	Digestion /ICP-MS fg cell ⁻¹	SC-ICP-MS fg cell ⁻¹	Digestion /ICP-MS fg cell ⁻¹
0.5	0.77 ± 0.22	0.79 ± 0.12	0.30 ± 0.13	0.24 ± 0.10
1	1.20 ± 0.53	1.10 ± 0.22	0.44 ± 0.21	0.47 ± 0.21
15	12.80 ± 5.58	18.19 ± 2.34	12.43 ± 4.36	14.96 ± 2.52

The percentage of *E. coli* cells containing Te increased from 35% to 59% for bacterial cells exposed to 0.5 and 1 mg Te L⁻¹ up to 94% at the highest level of exposure. In the case of *S. aureus*, the percentages increased from 57% to 76% for cell exposed to the lower concentrations up to 100 % at 15 mg Te L⁻¹. ANOVA analysis evidenced statistically significant differences (P<0.05) among values for Te amount per cell for

those bacteria treated with 0.5 and 1 mg Te L⁻¹ compared to 15 mg Te L⁻¹ as well as statistically significant differences between the Te amount found in both strains and in the presence of 0.5 and 0.1 mg Te L⁻¹ as TeNPs (Table 1).

The accuracy of the data provided by SC-ICP-TQ-MS for quantifying Te at individual bacterial cell level was thereafter assessed by combining ICP-TQ-MS in single quad mode after acid digestion (total Te concentration per bacterial cell) and flow cytometry (total bacterial cell population) measurements. As shown in Table 1, there is a good agreement between results obtained by both methods. Consequently, SC-ICP-TQ-MS seems to provide accurate data about the mass of TeNPs up-taken by individual bacterial cells with the advantage of delivering information on the variability from cell to cell.

Determination of the number of TeNPs in individual bacterial cells

The number of individual particles either internalized or adhered to bacteria wall was determined after the mechanical bacterial cell lysis with glass beads⁴¹. The performance of the method applied for bacterial cell disruption was assessed by monitoring the signals of phosphorous before and after applying the lysis procedure. Around a $(90 \pm 4) \%$ and $(92 \pm 2) \%$ of the cells were disrupted in *S. aureus* and *E. coli* experiments, respectively. Furthermore, tellurium was also monitored in a second run. The time resolved analyses for Te in Figure 5 demonstrate that the intensity of the events decreased after applying cell disruption being more pronounced at a level of exposure of 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs. The results obtained may corroborate that TeNPs were internalized by the bacterial cells or attached to bacteria cell wall.

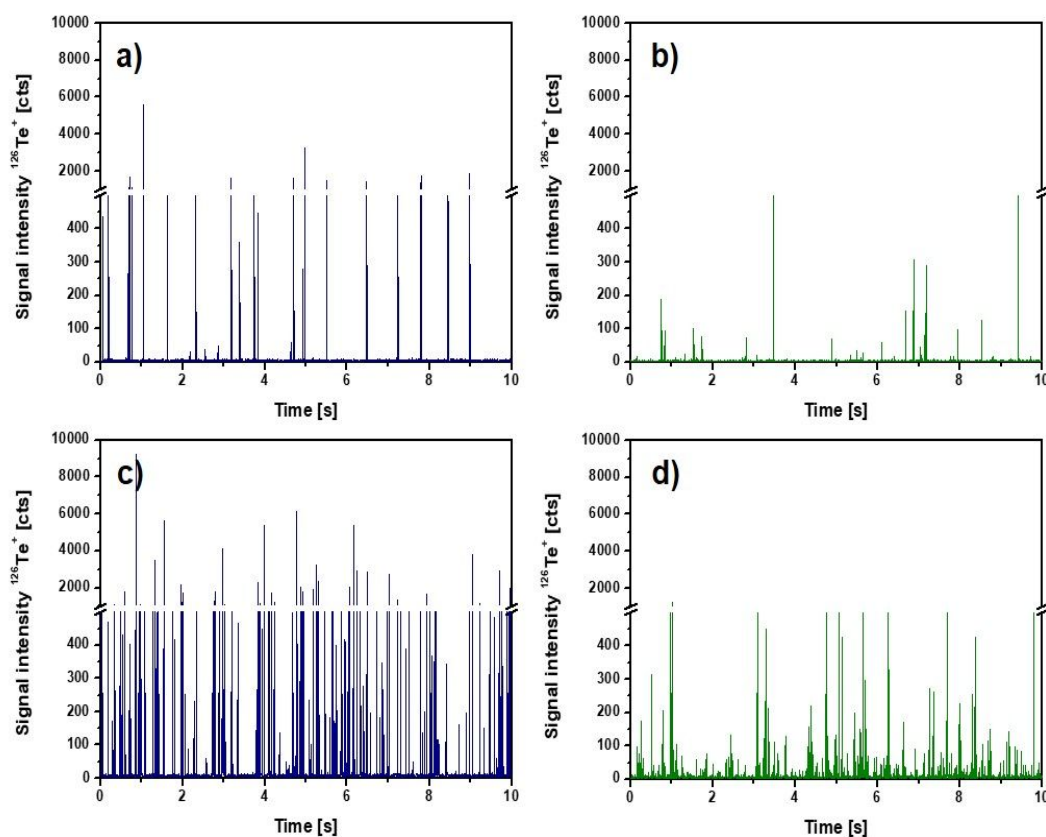


Figure 5: Time resolved SC/SP-ICP-MS analyses of ^{126}Te before (a and c) and after bacterial wall disruption (b and d) of *E. coli* (a and b) and *S. aureus* (c and d) cells treated with 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.

After disruption of the cell walls, the intensity of the events produced by individual nanoparticles was lower than those related to intact cells that could have accumulated more than one TeNP. Moreover, the number of events after the lysis procedure should raise when increasing the exposure concentration of TeNPs. This could not be clearly detected in time resolved analyses, likely due to TeNPs losses during the centrifugation step employed in the lysis procedure. With the knowledge of the mass of an individual particle and the mass of Te accumulated per cell from previous sections, the number of TeNPs internalized or associated to bacterial cell wall was calculated. Table 2 displays the average of nanoparticles detected in individual bacterial cells as well as the minimum and maximum number of particles after exposure to the three different Te concentrations. The number of particles increased with the applied TeNPs

concentration. Cells containing one single TeNPs only appear at 0.5 mg Te L⁻¹ whereas cells containing multiple TeNPs were detected at the higher concentrations in both bacterial strains. No significant difference between strains regarding to the number of particles accumulated was observed, although the maximum number of particles was higher in *E. coli*, probably due to the increased cell size.

Table 2: Average of TeNPs internalized or associated to bacteria cell wall per *S. aureus* and *E. coli* individual cell after the incubation of both strains with 0.5, 1, 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs determined by SP-ICP-MS after bacterial cell lysis.

[TeNPs] mg Te L ⁻¹	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	TeNPs cell ⁻¹			TeNPs cell ⁻¹		
	Min	Max	Media	Min	Max	Media
0.5	1	9	5 ± 2	1	4	4 ± 1
1	2	13	9 ± 4	2	11	7 ± 3
15	3	95	37 ± 27	3	122	50 ± 36

Sizing rod-shaped TeNPs by SP-ICP-MS and TEM measurements

The dimensional characterization of tellurium nanorods formed through the interaction of bacteria with the original spherical TeNPs was explored by Single-particle ICP-MS. this technique enable size characterization assuming that particles are of spherical shape,⁴². However, characterization of non-spherical nanoparticles by employing SP-ICP-MS is still in its infancy⁴³.

In the current work, dimensional size characterization of rod-shaped tellurium nanoparticles has been performed by employing TEM and SP-ICP-MS analysis. Calculations for estimating the width and length of tellurium nanorods were carried out by considering these nanoparticles with a cylindrical morphology. The procedure developed consisted on a step-by-step approach: 1) determination of the volume of nanorods by particle mass data (SP-ICP-TQ-MS) and particle density (from nanorods composition provided by X-ray diffraction) and 2) estimation of width and length of

tellurium nanorods by employing the formula for the volume of a cylinder and the aspect ratio previously determined by TEM analysis. The particle size detection limit for SP-ICP-MS was found to be 28 nm based on the 3σ criterion. Therefore, those particles with a volume below 11,494 nm³ were not considered for tellurium nanorods dimensional estimations. Consequently, and by assuming a LOD size of 28 nm, the smallest volumes employed for calculations were about 12,505 nm³ and 15,492 nm³ for *E. coli* and *S. aureus* experiments, respectively. A similar procedure has been reported by Kalomista *et al.* for dimensional size characterization of rod-shaped gold nanoparticles⁴³. Figures 6 and 7 show width and length size histograms calculated from tellurium nanorods isolated from *E. coli* and *S. aureus*, respectively, after exposure to the different Te concentrations.

The histogram profiles clearly demonstrate the variability of the nanorods dimensions, which confirms the heterogeneity of bacterial cell behaviour concerning the morphological TeNPs transformations and uptake. Furthermore, mean values for width and length calculated with SP-ICP-MS agreed well with those values provided by TEM at the highest concentration of TeNPs tested. No TEM data were available for comparison at the low exposition levels, since this technique was unable to detect the nanorods under those conditions. However, the SP-ICP-MS strategy developed here, is capable of providing data on the size of the nanorods at the lowest levels of exposure (0.5 and 1 mg Te L⁻¹), confirming that these are similar in width, but shorter in length than the ones produced after exposure to 15 mg Te L⁻¹ in both species of bacteria.

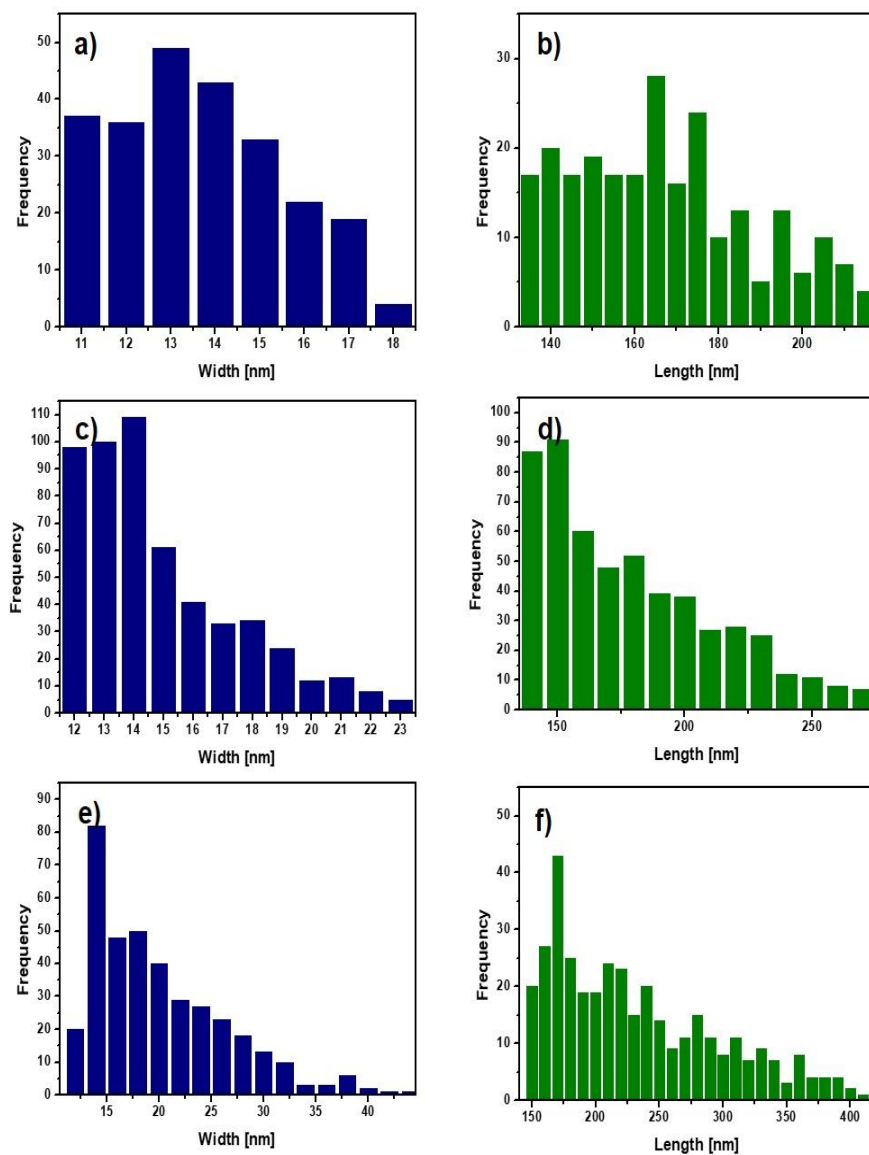


Figure 6: Size distribution histogram obtained from SP-ICP-MS analysis for width and length dimensions of rod-shaped TeNPs isolated from *E. coli* cells treated with (a and b) 0.5, (c and d) 1 and (e and f) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.

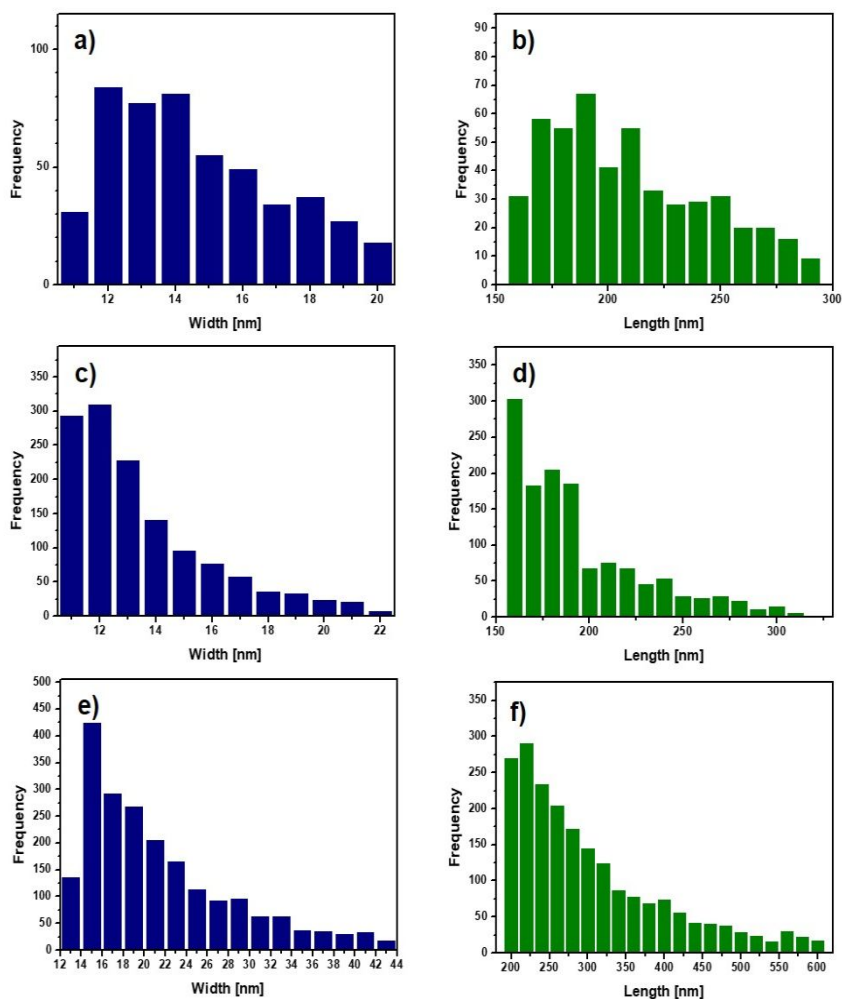


Figure 7: Size distribution histogram obtained from SP-ICP-MS analysis for width and length dimensions of rod-shaped TeNPs isolated from *S. aureus* cells treated with (a and b) 0.5, (c and d) 1 and (e and f) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs

Conclusions

This study shows for the first time the application of SC-ICP-TQ-MS for quantifying the uptake and distribution of TeNPs at single cell level in Gram-positive and Gram-negative bacteria, *S. aureus* and *E. coli*, respectively. The results confirmed a great cell to cell variability in terms of TeNPs uptake and number of particles accumulated. TEM analysis together with X-ray diffraction measurements evidenced compositional and morphological changes of TeNPs from nanospheres to nanorods as a consequence of bacteria-nanoparticle interaction. The combination of SP-ICP-MS and TEM has allowed

us to estimate the dimensions of nanorods. The values agreed with values from TEM images confirming the feasibility of the proposed strategy for the dimensional characterization of non-spherical nanoparticles and overcoming size limitations for TEM detection.

Notes : The authors declare no competing financial interest

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from Spanish Ministry for Science, Innovation and Universities (CTQ2017-83569-C2-1-R, RTI2018-094605-B-I00, FC-GRUPIN-IDI/2018/000242), the Community of Madrid and European funding from FSE and FEDER programs (project S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II CM), as well as the support from the Asturian Foundation for Biosanitary Research and Innovation (FINBA). Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, and Teledyne Cetac Technologies, Omaha, NE, USA, are acknowledged for their instrumental support.

SUPPORTING INFORMATION

Experimental details of Synthesis and Characterization of TeNPs, TeNPs internalization by bacteria, Flow cytometry analysis, Validation of SC-ICPMS measurements. Table S1: Operating parameters of the ICP-TQ-MS system for the single cell and single cell experiments. Figure S1: TEM images and EDXS spectrum of TeNPs dispersed (a) in water and (b) in LB medium. (c) X-ray diffraction pattern of TeNPs. Figure S2: Time resolved SC-ICP-MS analysis of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ for *S. aureus* cells treated with (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, and (d) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs. Figure S3. Time resolve SC-ICP-MS analysis of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ for *E. coli* treated with with (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, and (d) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.

References

-
- ¹ Nasrollahzadeh, M.; Sajadi, S.M.; Sajjadi, M.; Issaabadi, Z. Application of nanotechnology in daily life. *Interf. Sci. Technol.* **2019**, 28, 113-143.

- ² Katz, L.M.; Dewan, K.; Bronaugh, R.L. Nanotechnology in cosmetics. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, 85, 127- 137.
- ³ Gupta, R.; Xie, H. Nanoparticles in daily life: Applications, Toxicity and Regulations. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2018**, 37(3), 209-230.
- ⁴ Pathakoti, K.; Manubolu, M.; Hwang, H.M. Nanostructures current uses and future applications in food science. *J. Food Drug Anal.* **2017**, 25, 245-253.
- ⁵ Zheng, K.; Setyawati, M.I.; Leong, F.T.; Xie, J. Antimicrobial silver nanomaterials. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, 357, 1-17.
- ⁶ Lead, J.R.; Batley, G.E.; Alvarez, P.J.J.; Croteau, M.N.; Handy, R.D.; McLaughlin, M.J.; Judy, J.D.; Schrimmer, K. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects-an updated review. *Environ. Toxicol. Chem.* **2018**, 37, 2029-2063.
- ⁷ Kruszewska, J.; Kur, A.; Kulpinska, D.; Grabowska-Jadach, I.; Matczuk, M.; Keppler, B.K.; Timerbaev, A.R.; Jarosz, M. An improved protocol for ICP-MS based assessment of the cellular uptake of metal-based nanoparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, 174, 300-304.
- ⁸ Matczuk, M.; Ruzik, L.; Alksenko, S.S.; Keppler, B.K.; Jarosz, M.; Timerbaev, A.R. Analytical methodology for studying cellular uptake, processing and localization of gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2019**, 1052, 1-9.
- ⁹ Wei, X.; Dong-Hua, Z.; Cai, Y.; Jiang, R.; Chen, M.L.; Yang, T.; Xu, Z.R.; Yu, Y.L.; Wang, J.H. High-Throughput/High-Precision sampling of single cells into ICP-MS for elucidating cellular nanoparticles. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 14543-14550.
- ¹⁰ Merrifield, R. C.; Stephan, C.; Lead, J. Determining the concentration dependent transformations of Ag nanoparticles in complex media: Using SP-ICP-MS and Au@Ag core shell nanoparticles as tracers. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51, 3206–3213.
- ¹¹ Nguyen, V.K.; Choi, W.; Ha, Y.; Gu, Y.; Lee, C.; Park, J.; Jang, G.; Shin, C.; Cho, S. Microbial tellurite reduction and production of elemental tellurium nanoparticles by novel bacteria isolated from wastewater. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, 78, 246-256.
- ¹² Mousavi-Kamazani, M.; Rahmatolahzadeh, R.; Shobeiri, S.A.; Beshkar, F. Sonochemical synthesis, formation mechanism, and solar cell application of tellurium nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, 39, 233-239.
- ¹³ Ba, L.A.; Doring, M.; Jamier, V.; Jacob, C. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 8(19), 4203-16.
- ¹⁴ Figueroa, M.; Fernandez, V.; Arenas-Salinas, M.; Ahumada, D.; Muñoz-Villagrán, C.; Cornejo, F.; Vargas, E.; Latorre, M.; Morales, E.; Vásquez, C.; Arenas, F.

-
- Synthesis and antibacterial activity of metal(loid) nanostructures by environmental multi-metal(loid) resistant bacteria and metal(loid)-reducing flavoproteins. *Front. Microbiol.* **2018**, 15 (9), 959.
- ¹⁵ Huang, W.; Wu, H.; Li, X.; Chen, T. Facile one-pot synthesis of tellurium nanorods as antioxidant and anticancer agents. *Chem. Asian. J.* **2016**, 11(16), 2301-11.
- ¹⁶ Medina, D.; Tien-Streen, W.; Zhang, B.; Huang, X.; Vernet, A.; Nieto-Argüello, A.; Cholula-Díaz, J.L.; Martínez, L.; Huttel, Y.; Ijué, M.; García-Martín, J.M.; Webster, T.J. Citric juice-mediated synthesis of tellurium nanoparticles with antimicrobial and anticancer properties. *Green Chem.*, **2019**, 21, 1982-1998.
- ¹⁷ Shakibaie, M.; Adeli-Sardou, M.; Mohammadi-Khorsand, T.; Zeydabadi-Nejad, M.; Amirafzali, E.; Amirpour-Rostami, S.; Ameri, A.; Forootanfar, H. Antimicrobial and antioxidant activity of the biologically synthesized tellurium nanorods; a preliminary In vitro study. *Irani J. Biotech.*, **2017**, 15(4), 268-276.
- ¹⁸ Loeschner, K.; Navratilova, J.; Kobler, C.; Molhave, K.; Wagner, S.; von der Kammer, F.; Larsen, E.H. Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with Detection by conventional or single particle ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 8185-8195.
- ¹⁹ Loeschner, K.; Brabrand, M.S.J.; Sloth, J.J.; Larsen, E.H. Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 3845-3851.
- ²⁰ Peters, R.J.; Rivera, Z.H.; Van Bommel, G.; Marvin, H.J.; Weigel, S.; Bouwmeester, H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 3875-3885.
- ²¹ Dan, Y.; Zhang, W.; Xue, R.; Ma, X.; Stephan, C.; Shi, H. Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 3007-3014.
- ²² Laborda, F.; Bolea, E.; Jimenez-Lamana, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2016**, 9, 15-23.
- ²³ Li, F.; Armstrong, D. W.; Houk, R. S. Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1407-1413.
- ²⁴ Wang, H.; Wang, M.; Wang, B.; Zheng, L.; Chen, H.; Chai, Z.; Feng, W. Interrogating the variation of element masses and distribution patterns in single cells

-
- using ICP-MS with a high efficiency cell introduction system. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409, 1415-1423.
- ²⁵ Shigeta, K.; Koellensperger, G.; Rampler, E.; Traub, H.; Rottmann, L.; Panne, U.; Okinoc, A.; Jakubowski, N. Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, 28:637-645.
- ²⁶ Corte, M.; Alvarez-Fernández, R.; Blanco, E.; Bettmer, J.; Montes-Bayón, M. Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP- MS (SC-ICP-MS). *Anal. Chem.* **2017**, 89, 11491-11497.
- ²⁷ Wang, H.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. A facile Droplet-Chip-Time-Resolved Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Online System for determination of zinc in single cell. *Anal. Chem.* **2017**, 89(9), 4931-938
- ²⁸ Lopez-Serrano, A.; Baumgart, S.; Bremser, W.; Fleming, S.; Wittke, D.; Grützkau, A.; Luch, A.; Haase, A.; Jaubowski, N. Quantification of silver nanoparticles uptaken by single cell bacteria using inductively coupled plasma mass spectrometry in the single cell measurement mode. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, 33, 1256-1263.
- ²⁹ Mavrakakis, E.; Mavrouidakis, L.; Lydakis-Simantiris, N.; Pergantis, SA. Investigating the uptake of arsenate by *Chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect of their lipid profile using single cell ICP-MS and easy ambient sonic-spray ionization-MS. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 9590-9598.
- ³⁰ Liu, A.; Xue, A.; Chen, H.; Li, S. Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICPMS using dissolved standards for calibration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103, 1475-1483.
- ³¹ Merrifield, R.C.; Stephan, C.; Lead, J.R. Quantification of Au nanoparticles biouptake and distribution to freshwater algae using single cell ICP-MS. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, 52, 2271-2277.
- ³² Feng, Z.V.; Gunsolus, I.L.; Qiu, T.A.; Hurley, K.R.; Nyberg, L.H.; Frew, H.; Johnson, K.P.; Varanian, A.; Jacob, L.M.; Lohset, S.E.; Torelli, M.D.; Hamers, R.J.; Murphy, C.J.; Haynes, C.L. Impact of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 5186-5196.
- ³³ Gómez-Gómez, B.; Arregui, L.; Serrano, S.; Santos, A.; Pérez-Corona, t.; Madrid, Y. Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors on Quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation. *Metallomics* **2019**, 11, 1104-1114.

-
- ³⁴ Corte-Rodríguez, M.; Blanco-González, E.; Bettmer, J.; Montes-Bayón, M. Quantitative Analysis of Transferrin Receptor 1 (TfR1) in Individual Breast Cancer Cells by Means of Labeled Antibodies and Elemental (ICP-MS) Detection. *Anal. Chem.* **91**, 15532-15538.
- ³⁵ Borguese, B.; Brucale, M.; Fortunato, G.; Lanzi, M.; Mezzi, A.; Valle, F.; Cavallini, M.; Zannoni, D. Extracellular production of tellurium nanoparticles by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Hazard. Mater.* **2016**, 309, 202-209.
- ³⁶ Zare, B.; Faramarzi, M.A.; Sepehrizadeh, Z.; Shakibaie, M.; Rezaie, S.; Shahverdi, A.R. Biosynthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities. *Mater. Res. Bull.* **2012**, 47, 3719-3725.
- ³⁷ Shakibaie, M.; Adeli-Sardou, M.; Mohammadi-Khorsand, T.; Zeydabadi-Nejad, M.; Amirafzali, E.; Amirpour-Rostami, S.; Ameri, A.; Forootanfar, H. Antimicrobial and antioxidant activity of the biologically synthesized tellurium nanorods; a preliminary In vitro Study. *Iran. J. Biotechnol.* **2017**, 15, e1580.
- ³⁸ Vaigankar, D.C.; Dubey, S.K.; Mujawar, S.Y.; d'Costa, A.; Shyama, S.K. Tellurite biotransformation and detoxification by *Shewanella baltica* with simultaneous synthesis of tellurium nanorods exhibiting photo-catalytic and anti-biofilm activity. *Ecotox. Environ. Safe.* **2018**, 165, 516-526.
- ³⁹ Kim, D.H.; Kanaly, R.A.; Hur, H.G. Biological accumulation of tellurium nanorod structures via reduction of tellurite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioressour. Technol.* **2012**, 125, 127-131.
- ⁴⁰ Doherty, G.J.; McMahon, H.T. Mechanisms of endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 857-902.
- ⁴¹ Álvarez-Fernández García, R.; Corte-Rodríguez, M.; Macke, M.; LeBlanc, K.; Mester, Z.; Montes-Bayon, M.; Bettmer, J. Addressing the Presence of Biogenic Selenium Nanoparticles in Yeast Cells: Analytical Strategies Based on ICP-TQ-MS. *Analyst* **2020**, DOI: 10.1039/C9AN01565E.
- ⁴² Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. Single Particle Inductively Coupled Mass Spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 2270-2278.
- ⁴³ Kalomista, I.; Keri, A.; Unqor, D.; Csapó, E.; Dékány, I.; Prohaska, T.; Galbács, G. Dimensional characterization of gold nanorods by combining millisecond and microsecond temporal resolution single particle ICP-MS measurements. *J. Anal. At. Spectrom.* **2017**, 32, 2455-2462.

Supporting information

Single cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate bacterial uptake and morphological changes of tellurium nanoparticles

Beatriz Gomez-Gomez¹, Mario Corte-Rodríguez², M^a Teresa Perez-Corona¹, Jörg Bettmer², María Montes-Bayón², Yolanda Madrid^{1,*}

¹ Complutense University of Madrid. Dept of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry. Avda. Complutense s/n 2800, Madrid, Spain.

² University of Oviedo, Dept. of Physical and Analytical Chemistry, C/ Julián Clavería 8, E-33006 Oviedo, Spain.

TABLE OF CONTENTS

EXPERIMENTAL SECTION

Synthesis and characterization of tellurium nanoparticles (TeNPs)

TeNPs internalization in bacteria by (TEM)

Flow cytometry analysis

Data treatment and validation of SC-ICP-MS analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Table S1: Operating parameters of the ICP-TQ-MS system

for the single cell and single cell experiments.

Figure S1: TEM images and EDXS spectrum of TeNPs dispersed

(a) in water and (b) in LB medium. (c) X-ray diffraction pattern of TeNPs.

Figure S2: Time resolved SC-ICP-MS analysis of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}$

$^{+}$ for *S. aureus* cells treated with (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, and

(d) 15 mg Te L $^{-1}$ as TeNPs.

Figure S3: Time resolved SC-ICP-MS analysis of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{+}$

for *E. coli* cells treated with (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, and

(d) 15 mg Te L $^{-1}$ as TeNPs.

EXPERIMENTAL SECTION

Synthesis and characterization of tellurium nanoparticles (TeNPs)

Tellurium nanoparticles (TeNPs) were synthesized following the procedure previously reported by Gómez-Gómez et al.¹ Briefly, the chemical reduction of potassium tellurite (K_2TeO_3 , Sigma Aldrich) was carried out with gallic acid (Sigma Aldrich) in presence of hydroxyethyl cellulose (HEC, Sigma Aldrich) as coating agent. After that, TeNPs were purified through a dialysis process. The resulting TeNPs were fully characterized in terms of size, morphology and composition by TEM (JEOL JEM 2100, Peabody, MA, USA) equipped with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) microanalysis composition system (Oxford Instruments, High Wycombe, UK). Image J software was used for obtaining average diameter size of nanoparticles from a representative amount of TEM images. In addition, X-ray diffraction pattern for TeNPs was obtained using Panalytical X'PERT-MPD X-ray diffractometer (Malvern Panalytical, Ma, USA) operated at a voltage of 40 keV, 20 mA of current and 1.541 Å of Cu K α radiation. TeNPs were also characterized in the bacterial culture medium, Luria Bertani broth (LB), with the aim of evaluating its effect on the size distribution, morphology and stability

TeNPs internalization in bacteria by transmission electron microscopy (TEM)

Bacterial cells were exposed to different concentrations of TeNPs (as indicated above), then harvested by centrifugation at 7000 rpm during 3 min and finally washed with phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were then prepared for TEM observations through a process including fixation, dehydration, and embedding in a resin matrix. Briefly, bacterial cell pellets were fixed *in situ* with glutaraldehyde (2.5% v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and p-formaldehyde (4% v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS at 4°C for 4h. The resulting mixture was subsequently treated with osmium tetroxide (1% v/v) during 1h at room

temperature under darkness and then dehydrated in graded acetone series (from 30% to 100 %). Afterwards, pellets were treated first with a mixture of resin: acetone and finally with 100% resin. The resulting blocks were incubated at 65°C for 48h. Finally, ultrathin sections of samples were cut and examined by TEM.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry measurements in bacteria cell suspensions in presence and absence of nanoparticles were performed to determine the percentage of viable and non-viable cells and to establish the number of bacterial cells with the aim of calculating the transport efficiency of the sample introduction system. For cytometry analysis, bacterial cultures exposed to TeNPs were washed three times with tris-buffered saline (TBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and diluted with Milli-Q water until a bacterial cell concentration close to 10^5 cells mL⁻¹ was achieved. After that, diluted bacterial cell suspensions were incubated with SYTO 9 and propidium iodide (PI) fluorescent dyes (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) during 15 min. Finally, analyses were performed with a Flow Cytoflex S from Beckman Coulter (Brea, CA, USA).

Data treatment and validation of SC-ICP-MS analysis.

Data treatment of SC-ICP-MS analysis was carried out by applying an iterative procedure previously reported ². Briefly, the procedure consisted of selecting all data points that were three times standard deviation (3σ) above the mean. The mean value was previously calculated by considering all the entire data set. The remaining data set was submitted subjected again to the same procedure. The iterative procedure is repeated until there were no data points higher than the value of mean plus 3σ , and that value was used as threshold for cell events. The amount in *S. aureus* and *E. coli* cells at a single-cell level was determined by applying Equation 1²⁶:

$$m = \frac{\cdot F \cdot t \cdot I}{b} \quad (\text{Equation 1})$$

where m_c is the mass of the element in the cell, η is the transport efficiency for the liquid standards calculated using RM 8012 in the single particle mode, F is the sample flow rate, t is the integration time, I is the count rate of Te, and b is the slope of the Te calibration curve previously measured.

Finally, to validate the data obtained from SC-ICP-TQ-MS analysis, the uptake of TeNPs by *S. aureus* and *E. coli* was assessed by means of ICP-TQ-MS (single quad mode) after cell lysis, and referred to the number of bacteria present in the sample and counted by flow cytometry.

RESULTS AND DISCUSSION

Table S1: Operating parameters of the ICP-TQ-MS system for the single cell and single cell experiments.

ICP-MS parameters	
RF Power	1250 W
Plasma gas flow rate	15.0 L min ⁻¹
Auxiliary flow rate	0.8 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.8 L min ⁻¹
Cell gas flow rate (O ₂)	0.4 mL min ⁻¹ (for ³¹ P analysis)
Sheath gas flow rate	0.35 L min ⁻¹
Nebulizer	High performance concentric (HPCN)
Spray Chamber type	Total consumption, High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS
Sample flow rate	0.1 µl min ⁻¹
Data acquisition parameters	
Acquisition mode	Time resolved analysis
Dwell time	5 ms
Run time	120 s
Ions monitored (Q3)	³¹ P ¹⁶ O ⁺ , ¹²⁶ Te ⁺

Figure S1. Characterization of TeNPs

TeNPs were successfully synthesized as described in a previous report by Gómez-Gómez et al.¹. The TEM micrograph in Figure S1a evidences the presence of spherical nanoparticles with an average diameter size of (125 ± 40) nm. Size distribution was calculated by employing the ImageJ analysis software after observing more than 200 particles within 15 images. Furthermore, EDXS analysis confirmed the presence of Te in the nanoparticles ($L\alpha$ (3.77 keV), $K\alpha$ (27.47 keV) and $K\beta$ (31.72 keV)). Additionally, X-ray diffraction measurements were performed to establish the crystallographic phase and composition of TeNPs. Peaks from XRD spectrum (Figure S1c) of TeNPs were indexed as hexagonal phase of Te crystal (hexagonal space group: P3121 (152) and as orthorombic phase of TeO_2 (Pbca space group: 61) which is in good agreement with the standard literature data (card number 04-016-5126 and 04-007-0860 respectively). Moreover, XRD analysis indicated that the obtained TeNPs were composed of 80% TeO_2 and 20% Te.

TeNPs were also characterised by TEM in LB medium in order to identify potential morphological changes of nanoparticles when exposed to the bacterial culture medium. No significant differences in size, shape and agglomeration degree between nanoparticles dispersed in LB medium (Figure S1b) and aqueous solution (Figure S1a) were observed.

Figure S1: TEM images and EDXS spectrum of TeNPs dispersed (a) in water and (b) in LB medium. (c) X-ray diffraction pattern of TeNPs.

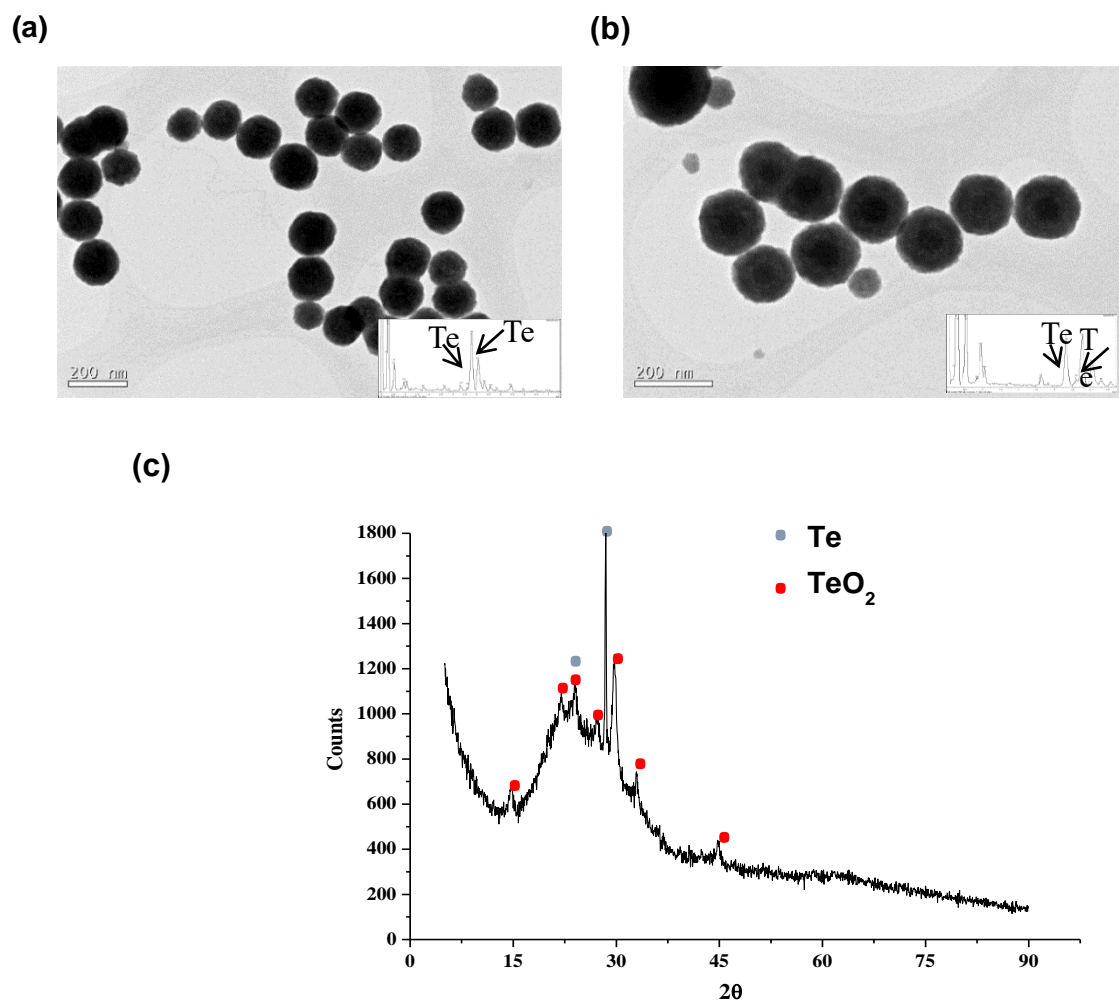


Figure S2: Time resolved SC-ICP-MS analysis of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ for *S. aureus* cells treated with (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, and (d) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.

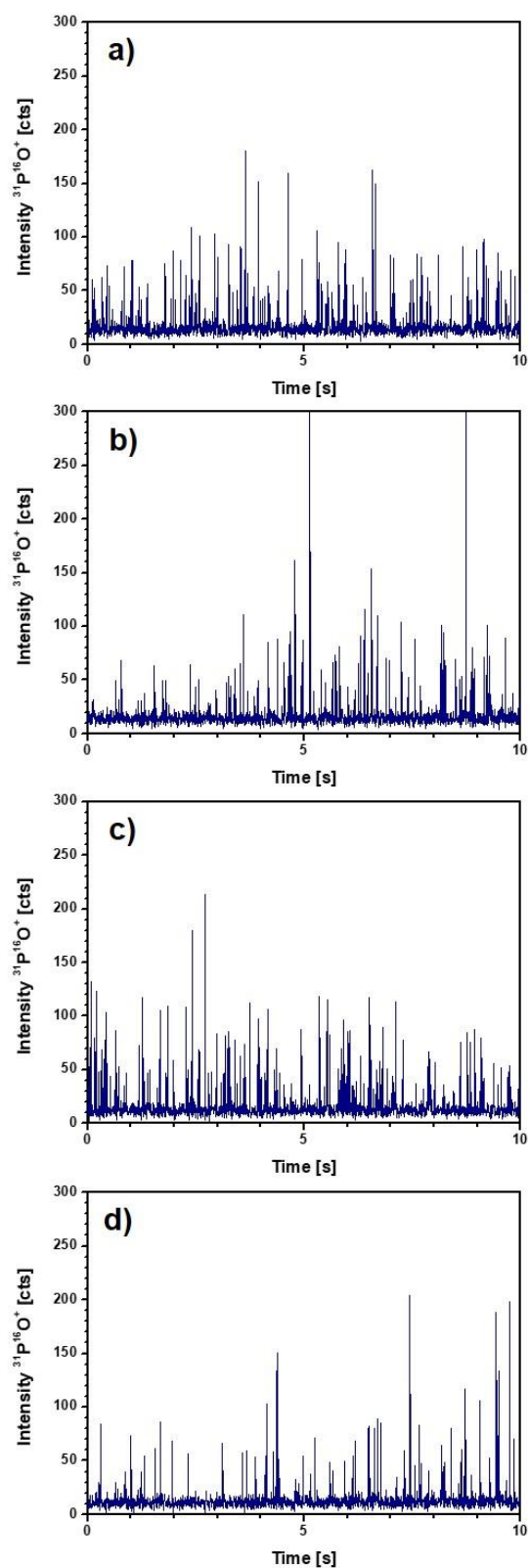
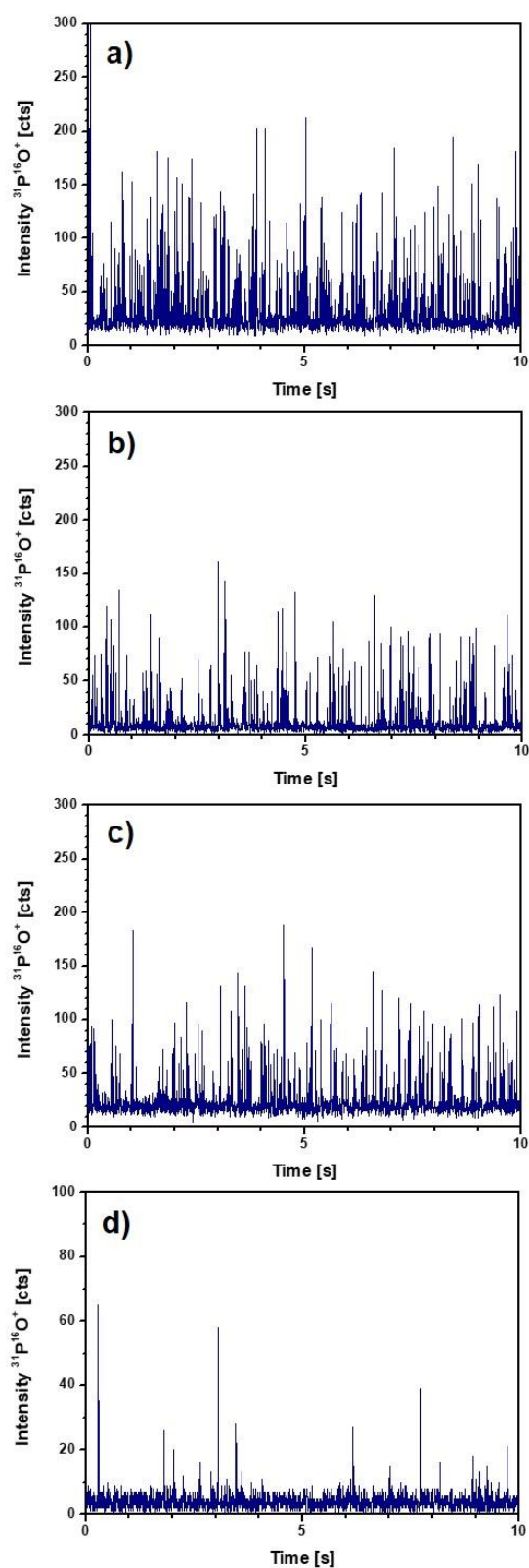


Figure S3: Time resolved SC-ICP-MS analysis of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ for *E. coli* cells treated with (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, and (d) 15 mg Te L⁻¹ as TeNPs.



References

- ¹ Gómez-Gómez, B.; Arregui, L.; Serrano, S.; Santos, A.; Pérez-Corona, t.; Madrid, Y. Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors on Quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation. *Metallomics* **2019**, 11, 1104-1114.
- 2 Corte, M.; Alvarez-Fernández, R.; Blanco, E.; Bettmer, J.; Montes-Bayón, M. Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP- MS (SC-ICP-MS). *Anal. Chem.* **2017**, 89, 11491-11497

DISCUSIÓN INTEGRADORA

DISCUSIÓN INTEGRADORA

En esta sección se discute de forma integral los resultados presentados en los capítulos anteriores con el fin de ofrecer una perspectiva global de los estudios desarrollados en el marco de esta Tesis Doctoral, cuyo hilo conductor hace referencia a las potenciales aplicaciones de las nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos y metaloides en la industria alimentaria, principalmente por su efecto en poblaciones microbianas.

El primer aspecto tratado en esta memoria es el desarrollo de probióticos enriquecidos en selenio mediante el empleo de bacterias ácido lácticas y especies de selenio, entre ellas las nanopartículas de selenio. Como se ha comentado en la Introducción, los nanomateriales se han empleado en la industria alimentaria para incrementar la biodisponibilidad de nutrientes esenciales. La elaboración de alimentos funcionales enriquecidos en ciertos componentes es, en la actualidad, una de las vías más exploradas para la incorporación de elementos esenciales a través de la dieta. En este sentido, los probióticos basados en bacterias ácido lácticas y enriquecidos en selenio, constituyen una alternativa viable para evitar los estados carenciales de este elemento esencial y, por tanto, para disminuir la incidencia de enfermedades asociadas a su deficiencia. Para establecer si una especie bacteriana resulta adecuada para el desarrollo de probióticos enriquecidos en un determinado elemento es de vital importancia, por un lado, investigar los mecanismos de acumulación y transformación del elemento por parte de la bacteria y su influencia en el metabolismo de la misma; y por otro, evaluar el efecto que las condiciones fisiológicas del proceso de digestión gastrointestinal produce sobre aspectos tales como la interacción elemento-bacteria, la supervivencia de las especies bacterianas enriquecidas y la capacidad de las mismas para adherirse a las mucosas intestinales.

En el primer trabajo presentado en esta tesis doctoral se evaluó el **potencial de dos cepas de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, *L. acidophilus* CRL 636 y *L. reuteri* CRL 1101, para su empleo en el desarrollo de probióticos enriquecidos en selenio.** Los resultados mostraron que ambas especies fueron capaces de crecer en presencia de 5 mg L⁻¹ de Se (como Na₂SeO₃), aunque los patrones de crecimiento fueron muy diferentes entre ambas, siendo la cepa ***L. reuteri* CRL 1101 la más resistente** al experimentar solamente una disminución de 1 log cfu/ml en la viabilidad celular después de 24 h de incubación. Sin embargo, la suplementación con selenio afectó de forma más acusada a la viabilidad de la cepa *L. acidophilus* CRL 636. Esta disminución de viabilidad

tuvo consecuencia en aspectos metabólicos de la bacteria como el consumo de glucosa, la producción de ácido láctico y el pH.

Las bacterias ácido lácticas desempeñan importantes funciones en la industria alimentaria debido a sus propiedades metabólicas. Las bacterias del género *Lactobacillus* metabolizan un amplio número de azúcares para producir ácido láctico como principal o único metabolito tras la fermentación, en función de si son especies heterofermentativas u homofermentativas, respectivamente. Los organismos heterofermentativos pueden producir además de ácido láctico, ácido acético, acetoina y peróxido de hidrógeno. Por tanto, un seguimiento de los componentes involucrados en las vías metabólicas de la fermentación de glucosa puede dar una idea de cómo la presencia de selenio afecta a los procesos metabólicos de las bacterias ácido- lácticas. Además de los cambios indicados anteriormente, se observaron también diferencias entre los cultivos control y los suplementados con selenio, en relación con el ácido acético consumido y liberado en ambas cepas. En los cultivos control se produjo el consumo de ácido acético durante las primeras 8 h de cultivo mientras que, por el contrario, en el caso de los cultivos enriquecidos con Se (en forma de Na_2SeO_3) se liberó ácido acético en este mismo periodo de tiempo. Asimismo, también se observó un incremento en la producción de etanol tras 24 h de incubación con Se. La conversión de acetato a etanol por parte de las bacterias en presencia de selenio ha sido descrito por otros autores en cultivos de la cepa *L. reuteri* Lb2, y ha sido atribuido a la sobreexpresión de la enzima acetaldehído-CoA deshidrogenasa/alcohol deshidrogenasa, responsable de la conversión de acetato en etanol.

Además de evaluar el efecto que el selenio tiene sobre el metabolismo de las bacterias, y en consecuencia sobre su capacidad fermentativa, otro aspecto clave es determinar la capacidad de las especies bacterianas de acumular y /o biotransformar selenio. En referencia a esto, los resultados obtenidos mostraron que **la capacidad de las bacterias de acumular selenio depende en gran medida de la cepa de LAB utilizada y del tiempo de exposición, encontrándose unos porcentajes de acumulación de Se del 78.6 % y 48.2 %, tras 24 h de incubación, para *L. reuteri* CRL 1101 y *L. acidophilus* CRL 636, respectivamente.** Para el estudio de la biotransformación de Se por estas cepas de LAB se utilizó el acoplamiento HPLC-ICP-MS, previa extracción de las especies de selenio mediante hidrólisis enzimática empleando proteasa. Tras la exposición de las bacterias al selenio (como Na_2SeO_3) durante 24 h, se sometió el pellet bacteriano a un proceso de hidrólisis enzimática, empleando para ello una sonda de ultrasonidos con el fin de disminuir los tiempos de tratamiento. La metodología aplicada permitió la extracción

cuantitativa de las especies de Se en un tiempo inferior a 3 min. **Los datos obtenidos, a partir de los perfiles cromatográficos de los extractos enzimáticos, evidenciaron que el 44 % y 59 % del Se acumulado en el pellet bacteriano de las cepas *L. acidophilus* CRL 636 y *L. reuteri* CRL 1101, respectivamente, se encontraba en forma de selenoaminoácidos, principalmente como SeCys y SeMet.** La identificación de estas especies de selenio se realizó comparando sus tiempos de retención con los de los respectivos patrones. Adicionalmente, con el fin de realizar una identificación inequívoca de las especies, se emplearon dos mecanismos cromatográficos, de intercambio aniónico y de fase reversa. Por tanto, en vista a los resultados obtenidos, se pudo determinar que *L. acidophilus* CRL 636 y *L. reuteri* 1101 eran capaces de acumular selenio y biotransformarlo a especies orgánicas de selenio (selenoaminoácidos) de gran interés desde el punto de vista nutricional, ya que entran a formar parte de las selenoproteínas. Un aspecto a destacar en este trabajo fue la detección de nanopartículas de selenio (SeNPs). Como se comentó en el Introducción, existen bacterias capaces de biotransformar selenio inorgánico a selenio elemental, es decir Se(0), en forma nanométrica fruto de un mecanismo de detoxificación. En definitiva, las cepas bacterianas estudiadas fueron capaces de biotransformar el selenio inorgánico y SeNPs, mejorando la biodisponibilidad de este elemento y el valor nutricional del probiótico desarrollado.

Una vez comprobado que las cepas bacterianas eran capaces de crecer en presencia de selenio, como Na₂SeO₃, y de biotransformarlo en especies orgánicas y nanopartículas, se estudió la tolerancia de las cepas selenizadas a las condiciones fisiológicas que se producen en el tracto gastrointestinal. La presencia de sales biliares no afectó al crecimiento de *L. acidophilus* CRL 636. Sin embargo, las células selenizadas de esta cepa exhibieron menos resistencia a la presencia de sales biliares, lo que provocó un efecto negativo en el crecimiento, que fue aproximadamente 2 veces menor que en el control tras 24 h de incubación. Por el contrario, el crecimiento de la cepa selenizada *L. reuteri* CRL 1101 no se vio afectado por la presencia de las sales biliares, mientras que, en el caso de las células control (crecidas en ausencia de selenio), sí que se pudo observar una disminución de dicho crecimiento. Por otra parte, las condiciones de pH que se dan en el intestino no afectaron negativamente al crecimiento bacteriano. Finalmente, se evaluó la capacidad de *L. acidophilus* CRL 636 y *L. reuteri* CRL 1101 para adherirse a las células epiteliales del intestino, lo que está relacionado con el grado de hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana. Este parámetro ha sido empleado en varios estudios para predecir la capacidad de adherencia de estas bacterias. Para estudiar el grado de hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana, se llevó a cabo el test de adherencia microbiana a hidrocarburos (MATH, Microbial Adhesion to Hydrocarbons). Los resultados

evidenciaron que la cepa *L. acidophilus* CRL 636 incrementó su hidrofobicidad y capacidad de adherencia en presencia de selenito, mientras que no se observaron diferencias a este respecto entre el control y las células selenizadas en el caso de *L. reuteri* CRL 1101. Según estudios previos publicados en la literatura científica, parece que la presencia de selenio en cultivos de la cepa *L. reuteri* Lb2 BM provoca la sobreexpresión del factor de elongación EF-Tu, el cual está involucrado en procesos de adhesión intestinal en otros organismos también empleados como probióticos.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que ambas cepas son aptas tanto para su empleo en la elaboración de productos fermentados enriquecidos en selenio, como para ser administradas como probióticos enriquecidos en este elemento esencial. Sin embargo, parece que la cepa *L. reuteri* CRL 1101 es la que mayor potencial exhibe para la elaboración de alimentos funcionales. Además, cabe destacar que este estudio no solo ha servido para determinar la utilidad de las especies de bacterias lácticas evaluadas para el desarrollo de alimentos funcionales, sino que también ha permitido investigar sobre los procesos de interacción entre el selenio y este tipo de bacterias.

Con el fin de profundizar en las respuestas biológicas observadas como consecuencia de la exposición de las bacterias ácido lácticas al selenio, se recurrió a la proteómica cuantitativa. Para este estudio, y atendiendo a los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionó la cepa *L. reuteri* CRL 1101. Para ello se identificaron las proteínas diferencialmente expresadas (alteradas) en las células de esta cepa bacteriana tras su exposición a dos formas diferentes de selenio: selenito (Na_2SeO_3) y SeNPs. La consecución de este objetivo fue posible gracias a la aplicación de la estrategia de marcaje metabólico SILAC junto con la espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS). Aunque en la literatura científica se pueden encontrar diferentes estudios proteómicos para elucidar los mecanismos que gobiernan la acumulación y transformación de selenio en bacterias ácido lácticas, esta fue la primera vez que se aplicó el marcaje metabólico SILAC en LAB para profundizar sobre este aspecto.

Se llevaron a cabo dos experimentos SILAC, uno con la población bacteriana expuesta a Se en forma de Na_2SeO_3 y otro con SeNPs. Se identificaron un total de 420 y 526 proteínas en los ensayos llevados a cabo con selenito y SeNPs, respectivamente, lo que supone un 23 y 28 % del total de proteínas disponibles en las base de datos Uniprot. De las proteínas identificadas, solo 271 en el caso del selenito y 321 en el caso de las SeNPs pudieron cuantificarse al cumplir el requisito establecido para la cuantificación de

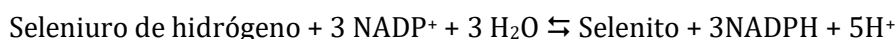
proteínas, que se basa en la identificación de al menos dos péptidos únicos por cada proteína identificada. **De entre las 271 proteínas cuantificadas en el experimento SILAC correspondiente a la adición de Na_2SeO_3 en el medio de cultivo, solo se encontraron 57 proteínas alteradas de las cuales 24 estaban sobreexpresadas y 33 inhibidas. En cambio, en el experimento SILAC donde el Se se adicionó en forma de SeNPs, de las 321 proteínas cuantificadas se hallaron 47 proteínas alteradas, de las cuales 17 estaban sobreexpresadas y 30 inhibidas. Además, cabe resaltar que de las 104 proteínas alteradas entre los dos experimentos solamente coincidieron 16. Esto quiere decir que la forma química de selenio administrada influye enormemente en el perfil de expresión de las proteínas, y por tanto en los mecanismos de metabolización del selenio por parte de *L. reuteri* CRL 1101.**

El resultado del cálculo de la agrupación jerárquica en cluster elaborado con las proteínas diferencialmente expresadas de los dos experimentos SILAC dio lugar al correspondiente mapa de calor y dendograma asociado. Esta agrupación jerárquica permitió establecer agrupaciones de proteínas en función del cociente SILAC y de la forma de suplementación de selenio (selenito o SeNPs). En concreto, se pudieron diferenciar ocho subgrupos. Las proteínas inhibidas en las dos condiciones con cocientes SILAC similares fueron agrupadas en el primer y segundo grupo dentro del mismo *cluster*, estando la mayoría de ellas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos. El siguiente grupo (grupo 3) contiene las proteínas inhibidas como resultado de la exposición a selenito, cuyo cociente SILAC era diferente a las que se habían clasificado en el primer grupo. Este tercer grupo es el más numeroso y diverso en relación a las funciones y procesos biológicos en las que estas proteínas están involucradas: oxidorreductasas, transducción, plegado y degradación, adaptación a los cambios ambientales y metabolismo de carbohidratos, vitaminas, nucleótidos, lípidos y cofactores. De la misma manera, las proteínas inhibidas por el efecto de las SeNPs que también tenían un cociente SILAC diferente a las clasificadas en el grupo 1 y 2, se englobaron en el grupo 4. Estas proteínas estaban relacionadas principalmente con el metabolismo energético. Por otro lado, las proteínas sobreexpresadas por efecto de la adición de SeNPs fueron clasificadas dentro de un mismo grupo (grupo 5), mientras que las sobreexpresadas por efecto del selenito se asociaron en distintos grupos (grupos 6, 7 y 8). También se encontraron diferencias en las funciones de las proteínas sobreexpresadas dependiendo de la forma de selenio añadida. Las que se encontraron sobreexpresadas por efecto del selenito estaban implicadas principalmente en procesos de traducción, adaptación a los cambios ambientales, plegado y degradación, mientras que las afectadas por SeNPs estaban relacionadas con el metabolismo de vitaminas, nucleótidos, lípidos y cofactores. Esto demuestra la gran

variabilidad en la expresión de proteínas en función de la forma química de selenio añadida en los medios de cultivo.

Una vez conocida la categoría y función de las proteínas diferencialmente expresadas a partir de la información extraída de la base de datos Gene Ontology, se procedió a asignar las posibles relaciones entre ellas. Las interacciones proteína-proteína juegan un papel primordial en muchas funciones celulares, por lo que su esclarecimiento puede ser clave para entender el metabolismo del selenio en bacterias ácido lácticas. Para llevar a cabo este estudio se empleó la herramienta de búsqueda STRING 10.5 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins).

En el estudio anterior se puso de manifiesto que la cepa *L. reuteri* CRL 1101 era capaz de acumular y transformar selenito en especies orgánicas de selenio, como la SeMet y la SeCys. Los datos obtenidos mediante el experimento SILAC y la herramienta de búsqueda STRING proporcionaron información acerca de los procesos a través de los cuales se produce esta biotransformación. Por ejemplo, **la sobreexpresión de la enzima triosa fosfato isomerasa corrobora que la cepa *L. reuteri* CRL 1101 es capaz de acumular Se tanto en forma de selenito como en SeNPs. Asimismo, la enzima cistationina beta liasa también apareció sobreexpresada tanto en los experimentos llevados a cabo con selenito como en los que se suplementó SeNPs. Esta enzima es la responsable de la catálisis de uno de los pasos previos a la producción de SeMet. De igual forma las enzimas tiorredoxina oxidasa y NADH oxidasa también se sobreexpresaron con la administración de ambas formas de selenio. Esta enzima se encuentra involucrada en la reducción de selenito a seleniuro de hidrógeno, uno de los metabolitos clave en la síntesis de SeCys, según la siguiente reacción:**



Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína tiorredoxina reductasa puede tener interés cuando se quiere considerar esta cepa bacteriana enriquecida con selenio como probiótico, ya que dicha proteína **está implicada en la protección de las células durante los procesos de estrés oxidativo.**

Igualmente, cabe destacar la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la síntesis de exopolisacáridos en ambos experimentos lo cual está relacionado con la capacidad de acumulación de Se por la cepa bacteriana objeto de estudio, debido a que el selenio puede unirse con facilidad a este tipo de polímeros. Sin embargo, la

sobreexpresión de este tipo de proteínas también aparece asociada como respuesta a condiciones de estrés.

En relación a las proteínas inhibidas, resulta de especial interés la inhibición en ambos experimentos de la lipoproteína ligasa A, responsable de la formación de un enlace amida entre los grupos lipoilo y la apoproteína. La inhibición de esta proteína tiene que ver con la resistencia de *L. reuteri* CRL 1101 a la presencia de selenio y a su incorporación a los lípidos.

Finalmente, es importante resaltar que **únicamente en el caso de los experimentos llevados a cabo con selenito se detectó la sobreexpresión de proteínas fágicas y chaperonas**. Esto podría explicar el mayor efecto de inhibición de esta especie de selenio en el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 comparado con las SeNPs, lo que sugiere que la suplementación de selenio en forma de selenito resulta más nociva para la bacteria que cuando se administra como SeNPs.

Como se ha podido observar, los estudios de acumulación y biotransformación de selenio en *L. reuteri* CRL 1101 en combinación con estrategias proteómicas, ha supuesto un gran avance en la elucidación del mecanismo responsable del metabolismo de selenio en bacterias ácido lácticas, lo que pone de manifiesto la relevancia biológica de los resultados presentados. Estos indican que el metabolismo de selenio en *L. reuteri* CRL 1101 parece estar gobernado por diversos procesos, incluyendo, entre otros, la sobreexpresión de proteínas involucradas en la producción de selenoaminoácidos, la generación de exopolisacáridos y la inhibición del metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Otro de los elementos considerado esencial para el buen funcionamiento del organismo es el cinc. Los estados carenciales de cinc tienen especial incidencia durante los primeros años de vida, puesto que este nutriente juega un papel primordial durante el crecimiento y desarrollo infantil. Una de las principales causas de los bajos niveles de Zn en el organismo es la ingesta de alimentos en los que la biodisponibilidad de este elemento es baja. Aunque, en un principio, la leche materna constituye la principal fuente de alimentación durante los primeros meses de vida, frecuentemente es necesario el empleo de fórmulas infantiles para satisfacer los requerimientos nutricionales de los lactantes. En las fórmulas lácteas infantiles se suele añadir el cinc en distintas formas químicas. Los compuestos de Zn permitidos por la Unión Europea para su inclusión en formulaciones infantiles son: sulfato de cinc, acetato de cinc, cloruro de cinc, óxido de zinc o gluconato de cinc. Sin embargo, el grado de asimilación de este elemento esencial va a depender, en

gran medida, de cómo se suministre dicho nutriente. Por ello, resulta imprescindible la realización de estudios que determinen la biodisponibilidad de este elemento esencial en este tipo de productos infantiles.

Uno de los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral se ha centrado en la **evaluación de la biodisponibilidad Zn y su unión a proteínas en distintas formulaciones infantiles**. La biodisponibilidad del Zn se determinó utilizando modelos *in vitro* que simulan, a escala de laboratorio, las distintas etapas de la digestión gastrointestinal. Este modelo *in vitro* se aplicó a distintos tipos de fórmulas infantiles recomendadas para diversos intervalos de edad (desde 1 día hasta 1 año) y con características muy variadas. De esta manera, se estudiaron fórmulas basadas tanto en leche de vaca como en leche de soja. Dentro de las primeras, se evaluaron fórmulas preparadas sin lactosa, para lactantes con alergias e intolerancias a la lactosa, con proteínas hidrolizadas y enriquecidas con distintos nutrientes.

Previo a los estudios de biodisponibilidad, se determinó la distribución del Zn en las fase lipídica y proteica de los productos infantiles, encontrándose que **prácticamente el 100 % del cinc estaba asociado a la fracción proteica**. Sin embargo, las fórmulas infantiles basadas en soja y sin lactosa presentaron porcentajes de cinc muy bajos en la fracción soluble de proteínas, entre el 7 % y el 24 %, siendo en el resto de las formulaciones del 95 %.

Con el fin de profundizar sobre el tipo de proteínas a las que el zinc se encontraba unido, las fracciones de proteína solubles obtenidas en la etapa anterior se analizaron mediante HPLC-UV-Vis y HPL-ICP-MS. Para ello se emplearon tres columnas cromatográficas de exclusión por tamaño (SEC) con diferentes intervalos de tamaños moleculares: columna Superdex 200, entre 10-600 kDa; Superdex 75, entre 3-70 kDa; y Superdex peptide, entre 0.1-7 kDa. **Los perfiles cromatográficos obtenidos evidenciaron que el cinc aparece unido principalmente a proteínas de bajo peso molecular (<10 kDa).**

La aplicación de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* permitió determinar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del Zn en las fórmulas infantiles. **Los porcentajes de bioaccesibilidad obtenidos fueron próximos al 70 % para todas las muestras de leche, excepto para la que estaba basada en soja, cuyo porcentaje de cinc bioaccesible fue del 30 %.** Este menor grado de bioaccesibilidad podría estar relacionado con el bajo contenido en cinc encontrado en la fracción proteica soluble (7 %). Como ya se ha mencionado anteriormente, la bioaccesibilidad y biodisponibilidad

de un nutriente depende en gran medida de la matriz del alimento. En el caso de la fórmula infantil elaborada con soja, la presencia de fitatos es un factor limitante para la asimilación de minerales por parte del organismo, lo que explicaría los bajos porcentajes de cinc encontrados en la fracción bioaccesible de esta fórmula infantil. Asimismo, la presencia de otros minerales también puede causar un efecto negativo en la bioaccesibilidad de cinc. En este sentido, el calcio en alimentos que tienen un alto contenido en fitatos también puede afectar negativamente a los niveles de absorción de cinc. Por otro lado, también sorprenden los elevados porcentajes de bioaccesibilidad encontrados en el resto de fórmulas infantiles (70 %). Esto puede deberse a que la mayoría de las formulaciones infantiles están constituidas por hidrolizados de proteínas con el objeto de favorecer el proceso de digestión por parte del lactante. Se conoce que la cantidad y el tipo de proteína que contiene el alimento también influye en la absorción del cinc, y por ello, las fórmulas infantiles en las que se especifica que las proteínas están altamente hidrolizadas, presentan los mayores porcentajes de bioaccesibilidad de este elemento esencial.

Otro de los componentes del alimento que puede afectar a la absorción del Zn es el contenido de grasa. Sin embargo, en este estudio, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los porcentajes de bioaccesibilidad de cinc en las muestras desgrasadas y en las que no se aplicó ningún tratamiento previo para eliminar el contenido graso de las fórmulas infantiles, lo que está en consonancia con los bajos porcentajes de cinc encontrados en la fracción lipídica.

Además de determinar el contenido de cinc en los extractos obtenidos tras las diferentes etapas de los modelos *in vitro* de digestión gastrointestinal, una porción de la fracción de la etapa intestinal fue también analizada mediante SEC-ICP-MS empleando la columna Superdex Peptide, cuyo intervalo de tamaños va desde 0.1 a 7 kDa. **Los perfiles cromatográficos indicaron que, en la fracción bioaccesible, el cinc se encuentra unido a biomoléculas de bajo peso molecular (<10 kDa).** Asimismo, dichos perfiles fueron muy diversos en función del tipo de fórmula infantil analizada, poniendo de manifiesto que la composición de estos productos influye en las interacciones de cinc con las biomoléculas presentes. Finalmente, se determinó el contenido de cinc en las fracciones cromatográficas tras el paso de los extractos por la columna Superdex Peptide. Los resultados mostraron que el 60 % del cinc total aparece unido a biomoléculas de bajo peso molecular, entre 0.1-7 kDa en el caso de la fórmula infantil basada en leche de vaca, mientras que en el caso de aquella basada en soja solo se encontró el 30 % del cinc total unido a estas moléculas de pequeño tamaño. Estos datos parecen indicar que el cinc

que se encuentra bioaccesible puede estar unido a moléculas de bajo peso molecular lo suficientemente pequeñas para poder a travesar las paredes del intestino y estar biodisponible para su posterior uso en diversas funciones fisiológicas.

Para corroborar esta hipótesis, se aplicó un proceso de diálisis a la disolución resultante tras el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. La diálisis es uno de los métodos más empleado para obtener información sobre la biodisponibilidad de nutrientes en alimentos, ya que considera que la fracción dializada es similar a la que estaría biodisponible. **Los porcentajes de cinc observados en esta fracción dializada fueron muy bajos, menores del 11 %,** siendo este el correspondiente a una fórmula infantil en cuya composición aparecen proteínas hidrolizadas y prebióticos, y que fue la que proporcionó mayor porcentaje de bioaccesibilidad de cinc. La presencia en conjunto de prebióticos, los cuales alteran la microbiota gastrointestinal en beneficio del lactante, y de proteínas lácteas hidrolizadas, puede influir en la biodisponibilidad de cinc. Esto puede justificar que esta fórmula infantil haya exhibido el mayor porcentaje de cinc en la fracción dializada. **Sin embargo, los porcentajes encontrados en la fracción dializada son mucho menores de lo esperado si se tienen en cuenta los resultados obtenidos mediante SEC-ICP-MS en los que se observó que la mayoría del cinc bioaccesible se encontraba unido a moléculas de bajo peso molecular, lo suficientemente pequeñas para ser absorbidas y, por tanto, estar biodisponibles.** Este hecho sugiere que parte del porcentaje de cinc encontrado como bioaccesible y que, además, se encontraba unido a moléculas pequeñas, no se dializó en las condiciones aplicadas. Aunque este tipo de ensayos son los recomendados a la hora de estimar la absorción de nutrientes en el intestino delgado, en muchas ocasiones, están limitados por otros factores, entre los que se puede destacar la propia selección de la membrana de diálisis que se va a utilizar. En algunos casos, las membranas comerciales de diálisis no separan con fiabilidad el tamaño que indican en sus especificaciones, produciéndose pérdidas del filtrado dentro de las membranas y bajas tasas de transporte.

Los estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad mediante procesos de digestión gastrointestinal *in vitro* constituyen una herramienta muy útil para estudiar los procesos de absorción de nutrientes y elementos esenciales. Sin embargo, los resultados que se han presentado sugieren que los datos obtenidos a partir de este tipo de modelos en los que se emplean membranas de diálisis, hay que considerarlos con cierta cautela. Por otro lado, los estudios de especiación mediante SEC-ICP-MS llevados a cabo en este trabajo exhiben un gran potencial para

estudios de biodisponibilidad y para poder profundizar en los procesos que afectan a la absorción de elementos esenciales como el cinc.

Un nutriente con un elevado valor de biodisponibilidad conlleva una mayor capacidad de asimilación por parte del organismo. Recientemente se ha propuesto el uso de la nanotecnología para mejorar la biodisponibilidad de elementos esenciales. Este es el caso de la nanopartículas de óxido de cinc, que se están considerando como fuente de cinc en vez de las sales de Zn anteriormente mencionadas. La suplementación de Zn en forma nanoparticulada puede suponer una disminución en el grado de toxicidad, respecto a las sales de Zn comúnmente empleadas, y un incremento en los niveles de asimilación por parte del organismo. Asimismo, este tipo de nanopartículas presentan propiedades antibacterianas, lo que las convierte en adecuadas para su aplicación en el desarrollo de envases alimentarios activos capaces de mejorar y preservar las propiedades y calidad de los alimentos, alargar su vida útil y mejorar la seguridad alimentaria. Como consecuencia de esto, también han aparecido numerosos estudios en los que se alerta sobre la necesidad de controlar el uso de este tipo de materiales en productos destinados al consumo y evaluar el riesgo que suponen para el consumidor. Sin embargo, esto no es una tarea fácil dada la dificultad que supone el análisis de nanomateriales en matrices complejas, como pueden ser los alimentos. Debido a esto, existe actualmente una necesidad analítica de buscar y desarrollar técnicas que permitan caracterizar de forma adecuada las nanopartículas en este tipo de matrices y además obtener información cuantitativa de sus propiedades.

Recientemente la EFSA ha emitido una serie de directrices encaminadas a la evaluación de riesgos producidos por el empleo de la nanociencia y la nanotecnología en la cadena alimentaria. De las numerosas recomendaciones que aparecen en dicha guía caben destacar dos: la importancia de emplear más de una técnica analítica para evaluar de forma correcta el impacto de la exposición a las nanopartículas y la necesidad de llevar a cabo ensayos que permitan elucidar el comportamiento de estos materiales en el tracto gastrointestinal.

Siguiendo las recomendaciones de la EFSA, en esta memoria se ha llevado a cabo la **evaluación de las transformaciones de las ZnONPs desde que son incorporadas a los envases alimentarios hasta que llegan al consumidor, como consecuencia de su posible migración al alimento.** Uno de los mayores inconvenientes del empleo de nanopartículas para el desarrollo de envases alimentarios es la migración de las mismas al alimento, originando un riesgo para el consumidor. Para poder llevar a cabo este estudio

se han aplicado las técnicas de SP-ICP-MS y TEM con el fin de obtener información cuantitativa de las transformaciones observadas.

Los materiales dopados con ZnONPs se prepararon en el laboratorio empleando dos materiales plásticos ampliamente utilizados como envases alimentarios: PET y LDPE. La razón de prepararlos en el laboratorio es debida a que en Europa no existen materiales plásticos que contengan ZnONPs disponibles comercialmente.

Las ZnONPs se sintetizaron empleando el método sol-gel, a partir de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ y gelatina. Tras 12 h de agitación, y a temperatura controlada, la suspensión obtenida se calcinó a 600 °C durante 5 h. Las partículas resultantes fueron caracterizadas mediante una amplia variedad de técnicas, incluyendo TEM, UV-Vis, FTIR, DLS y SP-ICP-MS. El análisis por SP-ICP-MS permitió determinar la concentración en número de partículas y masa (partícula L^{-1} y ng L^{-1} , respectivamente), la fracción disuelta y la distribución de tamaño. Los resultados obtenidos de distribución de tamaños fueron coincidentes con los proporcionados por TEM y DLS. Una vez sintetizadas y caracterizadas, las ZnONPs se incorporaron a los materiales plásticos (PET y LDPE) sumergiéndolos en la suspensión de nanopartículas. Los materiales resultantes fueron caracterizados por SEM. Las imágenes mostraron la adherencia de las ZnONPs sobre la superficie de ambos tipos de materiales así como una distribución homogénea de las ZnONPs en la superficie de los plásticos.

Los materiales plásticos dopados con ZnONPs se pusieron en contacto con dos matrices alimentarias distintas, una líquida y otra sólida: zumo de naranja (PET) y pechuga de pollo (LDPE). Tras diferentes tiempos de exposición (1, 7 y 14 días en el caso del zumo y 1, 14 y 26 días en el caso de la pechuga de pollo) se procedió a evaluar las transformaciones que la migración y el contacto con la matriz alimentaria habían producido sobre el tamaño y morfología de las ZnONPs. Asimismo, y siguiendo las recomendaciones de la EFSA, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de ZnONPs en número de partículas y en masa, y la cantidad de Zn^{2+} presente en las matrices alimentarias. Los resultados evidenciaron que el 100 % de las nanopartículas adheridas al PET migraron al zumo de naranja después de un único día de contacto. Sin embargo, en el caso del LDPE, se encontró un menor porcentaje de las nanopartículas (60 %) en la pechuga de pollo tras el primer día de exposición. Los porcentajes de migración no variaron a tiempos de exposición mayores.

El efecto en el tamaño y morfología de las ZnONPs, como consecuencia del contacto con las dos matrices alimentarias, se evaluó mediante TEM. **Las micrografías pusieron de manifiesto una disminución acusada del tamaño de las ZnONPs (de 80 ± 25 nm a**

11±4 nm) al estar en contacto con el zumo de naranja, independientemente del tiempo de exposición. Sin embargo, esta disminución de tamaño fue progresiva en el caso de las muestras de pechuga de pollo, observándose tamaños de 60±23 nm , 25±12 nm y 12±8 nm tras 1, 14 y 26 días de contacto, respectivamente, siendo el tamaño inicial de 80±25 nm. Asimismo, también se pudieron observar agregados de ZnONPs de tamaño cercano a 1 µm, lo que sugiere que la matriz alimentaria no solo afecta al tamaño de partícula sino también a su grado de agregación.

Además de la morfología y el tamaño de las nanopartículas, existen otros parámetros que la EFSA considera importantes para la evaluación de riesgos producidos por el empleo de las nanopartículas en la industria alimentaria. Estos parámetros son la concentración, tanto en masa como en número de partículas, y la fracción disuelta, es decir, la concentración de iones presentes en la muestra procedentes de la disolución parcial de las partículas. Para obtener este tipo de información se recurrió a la técnica SP-ICP-MS, no solo por la posibilidad que ofrece para detectar y cuantificar formas disueltas y particuladas del elemento en una única medida, sino también por ser una herramienta muy útil como método de *screening* para identificar la presencia de nanopartículas en matrices complejas.

La aplicación de SP-ICP-MS a la muestra de pechuga de pollo tras 1 día de contacto con el material detectó la presencia de pulsos sobre la línea base que eran indicativos de la presencia de nanopartículas. La variabilidad en la magnitud de las intensidades de los pulsos detectados sugiere la presencia tanto de partículas de pequeño tamaño como de agregados, lo que concuerda con lo observado anteriormente mediante TEM. De igual modo, la existencia de niveles elevados de señal de fondo indicó la presencia de altas concentraciones de Zn disuelto, cuyo efecto más significativo es el aumento en los límites de detección en tamaño para las ZnONPs, pasando de 26 nm (en dispersión acuosa) a 95 nm. En estas condiciones, el tamaño de partícula detectado para las ZnONPs en la pechuga de pollo fue de 207±33 nm. Por otro lado, y a pesar de los elevados valores de señal de fondo, se pudo obtener la concentración de ZnONPs en número de partículas y en masa, siendo de 4.73x10⁶ partículas mL⁻¹ y 252.8±0.5 µg L⁻¹ de cinc, respectivamente. A partir de estos valores se estimó el porcentaje de cinc nanoparticulado de tamaño inferior a 95 nm, que es el límite de detección en tamaño de esta técnica establecido en las condiciones de medida utilizadas. **De esta manera, se pudo establecer que el 72 % del cinc presente en la muestra de pechuga de pollo, tras estar en contacto durante 1 día con el material, se encontraba en forma de nanopartícula con un tamaño inferior a 95 nm.** Cabe indicar, que a pesar de las dificultades que supone obtener información cuantitativa

con SP-ICP-MS cuando los niveles de fondo son elevados, se ha podido estimar el porcentaje de partículas presente en la muestra.

Desafortunadamente, no se pudo obtener información en el caso de tiempos de contacto entre el alimento y el material de 14 y 26 días, debido a los elevados niveles de fondo detectados. Como ya se comentó en la Introducción, el incremento de la línea base dificulta enormemente establecer el límite entre la señal debida al fondo y la debida a las partículas, siendo este un aspecto clave para obtener datos cuantitativos mediante SP-ICP-MS. El incremento observado en la línea base de las muestras con tiempos de exposición superior es, probablemente, consecuencia de una mayor presencia de cinc en forma iónica (Zn^{2+}) y en forma de nanopartículas de tamaño inferior al límite de detección, siendo ambas debidas al efecto de la disolución de las ZnONPs al entrar en contacto con la matriz alimentaria.

Esto mismo sucedió en las muestras de zumo en contacto con el material alimentario con las ZnONPS adheridas. Los elevados niveles de fondo, debidos al pequeño tamaño de las nanopartículas ($< 10 \text{ nm}$) como consecuencia de su interacción con la matriz alimentaria, y debidos a la presencia de elevadas cantidades de cinc disuelto imposibilitaron su análisis por SP-ICP-MS con tiempos de lectura del orden de milisegundos

Por otro lado, en las directrices sugeridas por la EFSA, se hace especial hincapié en la necesidad de evaluar el comportamiento de las nanopartículas en el tracto gastrointestinal. Se conoce que las condiciones fisiológicas que se dan durante los procesos de digestión pueden alterar también las características físico-químicas de las nanopartículas, lo que condiciona su efecto en el organismo. Por ello, las muestras de zumo de naranja y pechuga de pollo resultantes de los estudios de migración se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* para estudiar las posibles transformaciones que pueden sufrir estas partículas si son ingeridas tras su migración al alimento.

El análisis de las muestras procedentes de los procesos de digestión gastrointestinal *in vitro* suponen un incremento de la complejidad de las matrices respecto a las estudiadas hasta ahora, por lo que fue necesario el empleo de una plataforma de técnicas analíticas compuesta por FAAS, TEM y SP-ICP-MS con el fin de obtener información complementaria sobre el comportamiento de las partículas en el tracto gastrointestinal. **De los resultados obtenidos se puede concluir que las ZnONPs presentes en la pechuga de pollo (como consecuencia de la migración desde el**

envase) alcanzan las paredes del intestino en forma de partículas con tamaño inferior a 10 nm, pero también formando agregados mayores de 200 nm y como Zn^{2+} disuelto. El porcentaje de Zn bioaccesible fue del 11 ± 1 %. Sin embargo, las partículas migradas a la matriz alimentaria líquida (zumo de naranja) alcanzarían las paredes del intestino en forma de nanopartículas de tamaño inferior a 3 nm, y como Zn^{2+} , disuelto, pero no como agregados. En este caso el porcentaje de cinc bioaccesible aumentaba hasta un 41 ± 3 %.

Cabe destacar que, al igual que en los estudios de migración, se aplicó la técnica SP-ICP-MS con tiempos de lectura del orden de milisegundos con el fin de caracterizar las ZnONPs durante el proceso de digestión gastrointestinal. La aplicación de la técnica se vio limitada por los elevados niveles de fondo debidos al cinc iónico presente como consecuencia de los procesos de disolución de las propias nanopartículas. En ambos casos (ensayos de migración y modelos *in vitro*), una disminución en los tiempos de lectura hasta alcanzar el orden de los microsegundo durante los análisis de SP-ICP-MS podría facilitar el establecimiento del límite entre la señal debida al fondo y la debida a las partículas, haciendo que los límites de detección en tamaños estén menos afectados por la presencia de especies disueltas. Sin embargo, en el caso de nanopartículas que se disuelven fácilmente, como es el caso de las de ZnONPs, muchas veces el empleo de tiempos de lectura del orden de microsegundos no resulta suficiente para obtener datos cuantitativos y fiables. De ahí la necesidad de emplear más de una técnica analítica para establecer el comportamiento de las nanopartículas con tendencia a disolverse en matrices complejas.

En este estudio, la combinación de las técnicas SP-ICP-MS y TEM han permitido demostrar la fuerte influencia que tiene tanto el tipo de matriz alimentaria como las condiciones fisiológicas que se dan durante los procesos de digestión gastrointestinal en las características físico-químicas de las nanopartículas.

Además del empleo de la nanotecnología en el ámbito del procesado de alimentos o del desarrollo de envases, también se ha propuesto su uso como alternativa para combatir la problemática del desarrollo de biopelículas, tanto en la industria alimentaria como en el sector clínico. Se sabe que la formación de biopelículas microbianas en superficies de contacto con alimentos o en equipos de procesados en la industria alimentaria, así como en material quirúrgico, implantes, válvulas cardíacas o catéteres en el ámbito hospitalario, supone un grave inconveniente, tanto por el problema

de salud pública que conlleva como por las pérdidas económicas que generan. Una de las estrategias más innovadoras para hacer frente a esta problemática es la interrupción de los sistemas de comunicación bacteriana, denominados *quorum sensing* (QS), responsables de la coordinación de comportamientos colectivos tales como la formación de estas biopelículas. Así, conocer el mecanismo mediante el cual las nanopartículas son capaces de interrumpir los sistemas *quorum sensing* puede significar un importante avance, por ejemplo, en el desarrollo de antibióticos de nueva generación. Por otro lado, conocer las interacciones de las nanopartículas con estos sistemas de comunicación supone disponer de una información muy útil para estudiar los riesgos que conlleva la liberación de nanomateriales al medio ambiente, ya que muchas de las comunidades microbianas que utilizan estos sistemas participan en numerosos procesos medioambientales y tecnológicos.

Para el estudio del **efecto de nanopartículas metálicas o de metaloides en los sistemas de comunicación QS en bacterias de tipo Gram negativas**, se ha elegido la especie modelo *Chromobacterium violaceum*, cuya capacidad para producir el pigmento de color morado, denominado violaceína, está regulado por procesos de QS. En la literatura científica, existen diferencias a la hora de seleccionar la cepa de *C. violaceum* empleada para llevar a cabo este tipo de ensayos. Mientras que algunos autores utilizan la cepa *C. violaceum* ATCC 12472, otros emplean la cepa mutante *C. violaceum* CV026. En esta última, una mutación en el gen *cvil* hace que no sea capaz de sintetizar la molécula señal, es decir las N-acil homoserina lactonas (AHLs), pero sí de producir violaceína en respuesta a una concentración específica de AHL exógena. Como consecuencia de esto, las etapas que pueden verse afectadas en el proceso de QS no tienen por qué ser las mismas, puesto que, por ejemplo, la etapa de biosíntesis del autoinductor (AHLs) en la cepa mutante no puede producirse. Por tanto, el empleo de las dos cepas indistintamente puede dar lugar a interpretaciones erróneas de los resultados. El comportamiento diferente entre las cepas, nos llevó a emplear ambas variedades (salvaje o mutante) con el fin de esclarecer la posible existencia de diferencias entre los resultados. Además, en todos los experimentos se controló el efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad de *C. violaceum* ATCC 12472 y *C. violaceum* CV026. Los sistemas QS son procesos dependientes de la densidad poblacional, por tanto, es necesario asegurarse de que los cambios en la producción de violaceína están originados por la disrupción de los procesos de QS y no por una disminución en la densidad de la población bacteriana.

Las nanopartículas metálicas seleccionadas para los ensayos fueron AgNPs, ZnONPs y TiO₂NPs debido a su amplio uso en productos de consumo, como por ejemplo

cosméticos, cremas solares, productos de higiene, en textiles, etc., y en diversas aplicaciones industriales. Las propiedades de las nanopartículas dependen de sus características físico-químicas, por ello, se ensayaron diferentes concentraciones, diferentes tamaños (40 y 60 nm), diferentes recubrimientos de las nanopartículas (PVP y citrato) cuando su síntesis requiere de este como en el caso de las AgNPs, y también el efecto de la radiación UV para el caso de las TiO₂NPs. Asimismo, también se incluyeron en estos estudios nanopartículas de metaloides, en concreto SeNPs y TeNPs, por el interés que han despertado durante los últimos años como alternativa a otro tipo de partículas, debido principalmente a sus propiedades antimicrobianas y anticancerígenas, así como a su menor toxicidad en comparación con algunas de las nanopartículas metálicas anteriormente mencionadas.

De esta manera, las nanopartículas se incubaron por separado con las dos cepas de *C. violaceum*, y el pigmento morado producido tras 24 h de incubación se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Vis. El efecto de las nanopartículas en la producción de violaceína se evaluó mediante el cálculo de los porcentajes de producción de este pigmento, considerándose como 100 % la cantidad de violaceína encontrada en los cultivos control (cepas no tratadas con las nanopartículas).

Los resultados correspondientes a **las ZnONPs (30 nm) mostraron que estas nanopartículas en un intervalo de concentración de 10 a 100 mg Zn L⁻¹ ocasionaban una disminución en la producción de violaceína tanto de *C. violaceum* ATCC 12472 como de *C.violaceum* CV026, debido a la alteración de los sistemas de QS.** A concentraciones superiores a 100 mg Zn L⁻¹ también se observó una disminución en la producción de violaceína. Sin embargo, esta disminución fue acompañada por una disminución en la densidad de población, por lo que no se puede asegurar con certeza que los efectos sobre la producción de violaceína a concentraciones mayores de 100 mg Zn L⁻¹ se debiesen a una perturbación del QS.

En los ensayos llevados a cabo con las AgNPs, se observó que el efecto en la producción de violaceína era dependiente del tamaño, en el caso de la cepa mutante, y del recubrimiento, en ambas cepas. Así las **AgNPs de menor tamaño (40 nm) y con citrato como recubrimiento fueron las que mayor impacto tuvieron en la producción de violaceína.** En este caso, todos los cambios observados en este pigmento fueron consecuencia de la alteración de los sistemas QS, ya que no se observó disminución de la viabilidad de las poblaciones bacterianas en ninguna de las condiciones ensayadas.

De la misma manera, las **TiO₂NPs solo afectaron a la producción de violaceína en ambas cepas de *C. violaceum* a elevadas concentraciones de exposición (250 y 500 mg Ti L⁻¹ de TiO₂NPs)**. De nuevo la disminución de la concentración de violaceína fue resultado de la alteración del QS, ya que no se observó cambios en la viabilidad. Además, en este caso también se estudió el efecto de la radiación UV, ya que se conoce que estas partículas ejercen un mayor efecto antimicrobiano cuando son irradiadas, gracias a sus propiedades fotocatalíticas. Sin embargo, en los experimentos no se observaron diferencias en cuanto a la producción de violaceína entre los ensayos llevados a cabo en ausencia y presencia de radiación UV.

En cuanto a las SeNPs y TeNPs, las primeras solo ocasionaron una disminución en la producción de violaceína en la cepa salvaje y a la concentración más elevada (250 mg Se L⁻¹ de SeNPs). Por el contrario, **solo fueron necesarios 50 µg Te L⁻¹ en forma de nanopartículas para inhibir casi el 70 % de la producción de violaceína en la cepa mutante, y a partir de 100 µg Te L⁻¹ dicha disminución fue mayor del 80 % en ambas cepas**. Asimismo, ni las SeNPs ni las TeNPs afectaron a la viabilidad de las poblaciones bacterianas, indicando que la alteración en los niveles de violaceína era resultado de la interrupción de los sistemas de QS.

Por otro lado, cabe destacar que **la disminución en los porcentajes de producción de violaceína, independientemente del tipo de nanopartículas añadidas, fue diferente dependiendo de la cepa ensayada**. Esto evidencia la necesidad de establecer un protocolo común para que los resultados de los ensayos de inhibición de QS empleando la cepa sensora *C. violaceum* sean comparables.

Con el propósito de profundizar en la influencia de las nanopartículas en los procesos de comunicación bacteriana en *C. violaceum*, se estudió en cuál de las etapas involucradas en el sistema QS tienen un mayor efecto las nanopartículas ensayadas. La consecución de este objetivo fue posible gracias a la combinación de los resultados obtenidos con las dos cepas bacterianas, y a los ensayos de viabilidad llevados a cabo. Los resultados obtenidos parecen indicar que **las ZnONPs y las TeNPs tienen un mayor impacto en la percepción de la señal y en el desencadenamiento de la respuesta** que en la síntesis de la señal de QS. Por el contrario, **las AgNPs, TiO₂NPs y SeNPs afectan en mayor medida al proceso de biosíntesis del autoinductor** que a los procesos relacionados con la percepción de la señal y su respuesta.

En definitiva, los datos presentados ponen de manifiesto el efecto importante que las nanopartículas ejercen sobre los sistemas de QS mediados por AHLs. Este

efecto depende tanto de la naturaleza de las partículas como de su concentración. Esto demuestra, por un lado, que el empleo de estas nanopartículas puede constituir una alternativa para combatir el desarrollo de biopelículas y, por consiguiente, de la aparición de infecciones persistentes. Pero por otro, también pone de manifiesto el riesgo que puede suponer su liberación para el medio ambiente y los ecosistemas.

Además de la alteración de los sistemas de *quorum sensing*, otras estrategias para combatir la formación de biopelículas mediante la nanotecnología se centran en el empleo de las siguientes aproximaciones: impedir la adhesión inicial de los microorganismos a las superficies, alterar la estructura de la biopelícula e inducir la dispersión de los *biofilms*. Siguiendo esta línea, también se quiso investigar el efecto que tenían las nanopartículas de SeNPs y TeNPs, mucho menos estudiadas que las metálicas, en este otro tipo de estrategias.

Para los estudios llevados a cabo con las SeNPs se escogió la bacteria modelo *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria Gram negativa se encuentra formando biopelículas en distintos entornos de la industria alimentaria, como por ejemplo en las superficies de corte. Asimismo, es responsable de muchas de las infecciones nosocomiales adquiridas en el entorno hospitalario, ya que puede crecer en forma de biopelículas en material quirúrgico, implantes, catéteres o prótesis, entre otros dispositivos.

Las nanopartículas de SeNPs se sintetizaron por reducción de una sal de selenio (Na_2SeO_3) en presencia de ácido ascórbico y empleando HEC como agente estabilizante. Uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de utilizar nanopartículas en ensayos microbianos es la estabilidad de las mismas en los medios de cultivo. Por ello, tras su síntesis, estas nanopartículas fueron caracterizadas en el medio de síntesis y en los medios de cultivo mediante TEM. Las imágenes obtenidas mostraron nanopartículas dispersas y de tamaño próximo a 90 nm en ambos medios.

Con el objetivo de determinar el efecto de las SeNPs en la biomasa total de la biopelícula desarrollada por *P. aeruginosa*, se realizaron en primer término ensayos de tinción con cristal violeta. Además, los estudios fueron planteados considerando la evaluación de dos posibles acciones: el impacto de las partículas en la inhibición de la formación del *biofilm*, o en la eliminación de la biopelícula ya formada. **Los resultados mostraron que concentraciones de 100 y 250 mg Se L⁻¹ en forma de SeNPs originaban una inhibición de la formación del *biofilm* del 60 % y 70 %, respectivamente, con respecto al control. Sin embargo, solo se consiguió la**

eliminación del 15 % del *biofilm* previamente establecido a la mayor concentración de SeNPs ensayada (250 mg Se L⁻¹ como SeNPs). Por tanto, de este experimento se puede deducir que las SeNPs presentan una mayor efectividad frente a la inhibición que respecto a la eliminación de las biopelículas. Estos resultados se pueden relacionar con los obtenidos en los experimentos de inhibición de QS utilizando SeNPs. Según estos ensayos, las SeNPs parecían interrumpir los sistemas de comunicación bacteriana (QS), lo que concuerda con esta capacidad encontrada para inhibir la formación de biopelículas en la que los sistemas de señalización desarrollan un papel clave en las primeras etapas de formación del *biofilm*. Sin embargo, una vez que la biopelícula ya se ha formado, la señalización mediante QS es una etapa menos crítica, motivo por el cual las SeNPs son menos efectivas en la eliminación de *biofilms* preestablecidos.

Los datos que aporta el ensayo colorimétrico del cristal violeta no permiten obtener información de las propiedades estructurales de las biopelículas, lo cual es crítico para establecer los cambios que las SeNPs pueden producir en la arquitectura del *biofilm* y en la distribución espacial de las células viables y no viables en el interior del mismo. Para poder estudiar este aspecto, es imprescindible recurrir a las técnicas de microscopía, como por ejemplo la microscopía confocal láser de barrido (CLSM). Esta técnica, en combinación con softwares informáticos específicos (ImageJ y bioImage_L) que permiten el tratamiento de las imágenes, hacen posible, por un lado, construir una imagen en 3D de la estructura de la biopelícula y, por otro, obtener parámetros estructurales cuantitativos. Además, el tratamiento previo de la muestra con los fluorocromos SYTO9/IP posibilita calcular el porcentaje de células viables y no viables en el interior de la biopelícula.

Las imágenes adquiridas mediante CLSM y posteriormente tratadas con el programa de tratamiento de imágenes muestran **cómo las SeNPs producen una notable alteración de la estructura de la biopelícula formada por *P. aeruginosa* a medida que la concentración de las nanopartículas aumenta, llegándose a reducir el biovolumen de la biopelícula en un 98 % tras la adición de 250 mg Se L⁻¹ en forma de SeNPs.** Sin embargo, cabe resaltar que, a pesar de esta drástica reducción del biovolumen, el porcentaje de células viables permanece constante. Otro de los parámetros estructurales que se ve afectado por la presencia de las SeNPs es el porcentaje de superficie cubierta, lo que indica que estas partículas debilitan la capacidad de adhesión de *P. aeruginosa* a la superficie. Asimismo, la aplicación de otras técnicas de microscopía, como la microscopía de contraste de fases (PCM) y de contraste de interferencia diferencial (DICM), permitió corroborar lo observado mediante CLSM y, además, hizo

posible la visualización de la adhesión de las partículas en la superficie del *biofilm* al quedar teñido de rojo, color característico de las SeNPs.

La aplicación del ensayo de tinción con violeta cristal y el estudio por CLSM proporcionaron diferentes porcentajes de inhibición de la biopelícula y de reducción de biovolumen. Esto es debido a que cada técnica proporciona información de un aspecto diferente del *biofilm* bacteriano, pudiéndose considerar, por tanto, técnicas complementarias. El empleo de diversas técnicas en el estudio de biopelículas es de vital importancia dada la complejidad de estas estructuras biológicas, lo que todavía se vuelve más esencial cuando sistemas como las nanopartículas están involucrados en este tipo de ensayos.

Las TeNPs también se evaluaron mediante este tipo de estudio. Aunque menos conocidas y estudiadas que las SeNPs, estas nanopartículas están suscitando un gran interés por sus propiedades antimicrobianas y anticancerígenas.

Como etapa previa se llevó a cabo la optimización del método de síntesis de estas partículas en base a la experiencia que se tenía en el grupo de investigación. La síntesis se basó en la reducción de una sal de telurio (K_2TeO_3) con ácido gálico, empleando como agente estabilizante HEC. Tras la síntesis, se llevó a cabo la caracterización de sus propiedades físico-químicas. **Sin embargo, conocer las propiedades de nanopartículas que no son comerciales, y de las que se dispone de escasa información, es una tarea complicada que requiere el uso de múltiples técnicas analíticas.** En concreto, para la caracterización de las TeNPs se emplearon técnicas de microscopía electrónica, técnicas basadas en la dispersión de luz, técnicas espectroscópicas, técnicas de separación como la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF⁴) y técnicas basadas en ICP-MS empleando SP-ICP-MS.

El análisis por TEM permitió establecer el tamaño y la morfología de las nanopartículas. Las imágenes mostraron **la presencia de nanopartículas de morfología esférica, con un tamaño medio de 125 ± 40 nm y una distribución de tamaños muy heterogénea.** Aunque los análisis de EDXS confirmaron la presencia de Te en las nanopartículas, se quiso profundizar en la composición de estas nanopartículas, para lo que se recurrió a espectroscopia de infrarrojo y a la difracción de rayos X. El espectro de FTIR reveló la presencia de dos bandas de absorción correspondientes a un enlace Te-O que indicaba que en **la composición de las nanopartículas sintetizadas había TeO_2** . Esto fue corroborado mediante la técnica de difracción de rayos X, donde los espectros de difracción mostraron picos correspondientes a la fase hexagonal de telurio cristalino y a la

fase ortorrómbica de TeO_2 , es decir, las nanopartículas contenían ambos Te elemental y TeO_2 en su composición. Finalmente, mediante el tratamiento de los espectros obtenidos se pudo determinar de forma semicuantitativa el porcentaje de cada fase presente, asignándose **porcentajes de 80 % y 20 % para las fases de TeO_2 y Te** indicadas anteriormente. Por otro lado, en los espectros de UV-Vis se observaron tres bandas de absorción, a 295 nm, 365 nm y 635 nm, longitudes de onda coincidentes con datos que aparecen en la bibliografía.

Las técnicas de dispersión de luz DLS y NTA permitió la caracterización de las TeNPs en suspensión acuosa, encontrándose **un tamaño hidrodinámico y un potencial zeta de 167 ± 47 nm y -20 mV, respectivamente**. Estos valores confirmaron lo que ya se había observado por TEM, la polidispersidad de la dispersión (amplio intervalo de tamaños) y la agregación de las partículas al obtenerse valores de potencial zeta bajos (en valor absoluto). El potencial zeta, que se corresponde con el límite de la doble capa eléctrica que se forma en torno a una partícula en suspensión, da una idea de la estabilidad del sistema. De esta forma, potenciales zeta menores de -30 mV y mayores que 30 mV indican dispersiones estables, sin embargo, cuando dichos valores se encuentran dentro de este intervalo quiere decir que las fuerzas de repulsión no son lo suficientemente fuertes para evitar la agregación de las partículas.

Debido a que la técnica DLS presenta limitaciones cuando se analizan suspensiones con tamaños muy diversos, se decidió validar estos datos con la técnica NTA, **cuyas medidas proporcionaron un tamaño de 138 ± 80 nm, así como una concentración de 5.8×10^{11} partículas mL^{-1}** .

Las nanopartículas también fueron caracterizadas en el medio de cultivo bacteriano para comprobar que este no tenía ningún efecto sobre las propiedades de las partículas originales. **Las imágenes de TEM indicaron que el medio de cultivo no producía ninguna modificación del tamaño, forma o estado de agregación de las partículas respecto a su estado original**.

Además de las técnicas de microscopia, espectroscópicas y de dispersión de luz, el análisis por ICP-MS acoplado a diferentes mecanismos de separación también es una herramienta muy útil para investigar las propiedades de las nanopartículas y su comportamiento en dispersión acuosa. En este sentido, la ultrafiltración en combinación con ICP-MS se aplicó, por un lado, para estudiar la existencia de especies disueltas de Te en las dispersiones de TeNPs y, por otro, para optimizar la metodología de purificación más adecuada para eliminar la fracción disuelta antes del empleo de las dispersiones de

TeNPs en los ensayos con bacterias. Aunque tanto la centrifugación como la diálisis proporcionaron buenos resultados en relación a la eliminación de la fracción disuelta de la dispersión de nanopartículas, se seleccionó la primera por su mayor sencillez, menor tiempo de ejecución y para evitar las pérdidas por adhesión a la membrana de diálisis de las nanopartículas.

La caracterización de nanopartículas se llevó también a cabo mediante la técnica de separación AF⁴ empleando ICP-MS como sistema de detección (AF⁴-ICP-MS). El objetivo perseguido con el uso de este acoplamiento es la separación de las nanopartículas de la dispersión de TeNPs por tamaños, ya que según los datos proporcionados por TEM y DLS, en la misma dispersión hay distintas poblaciones de partículas diferenciadas según su tamaño. En concreto, la aplicación de esta metodología requiere la optimización de un gran número de parámetros experimentales, entre los que cabe citar: el caudal del flujo cruzado (cross flow), la composición de la fase móvil y el material y espesor de la membrana. Dentro de esta optimización se ensayaron tres tipos de membrana: celulosa regenerada (RC), triacetato de celulosa (CTA) y poliestersulfona (PES); tres composiciones distintas de la fase móvil: SDS al 0.0125 %, agua de calidad Milli-Q a pH 6.4 y (NH₄)₂CO₃ de concentración 0.1mM a pH 8.9; y diferentes caudales de flujo cruzado, entre 0.2-1.0 mL min⁻¹.

La selección de las condiciones óptimas de separación se basó en los porcentajes de recuperación obtenidos. Estos porcentajes dan una idea de la interacción entre las nanopartículas y la membrana, aspecto clave en la separación a través del canal de AF⁴. **Los mejores porcentajes de recuperación se consiguieron empleando 0.1mM de (NH₄)₂CO₃ a pH 8.9 como disolución portadora, con la membrana de PES, y a un caudal de flujo cruzado de 0.2 mL min⁻¹.** Cabe destacar que, en todas las situaciones estudiadas, el aumento en el caudal de flujo cruzado ocasionó una disminución en los porcentajes de recuperación poniéndose de manifiesto la fuerte interacción entre las nanopartículas y cualquiera de las membranas utilizadas en el sistema. Además, **un incremento del caudal del flujo cruzado originó una disminución en los tiempos de retención de los picos que aparecían en los fractogramas resultantes.** Sin embargo, según la teoría en la que se fundamentan la técnica AF⁴, el tiempo de retención debe de aumentar a medida que se incrementa el caudal de flujo cruzado. Este comportamiento inusual es debido **a una inversión en el modo de elución, de forma que la elución de las TeNPs se produce en modo estérico.** El modo de elución normal está gobernado por el movimiento Browniano y, por tanto, las nanopartículas de menor tamaño son las que primero eluyen del canal. Pero en el modo estérico, la separación está controlada por las

fuerzas de repulsión entre la membrana y las nanopartículas, mientras que la difusión por el movimiento Browniano pasa a ser prácticamente insignificante, ya que las partículas no pueden aproximarse a la pared de acumulación. En estas condiciones, el orden de elución se invierte respecto al modo normal y, como resultado, las partículas de mayor tamaño eluyen antes que las más pequeñas. El modo de elución estérico de las TeNPs puede ser consecuencia del tamaño relativamente elevado de las partículas (>100 nm) y la polidispersidad de las dispersiones. Por otro lado, la aparición de un solo pico en los fractogramas, junto con el pico de inyección, sugiere que **ambos modos de elución han podido coexistir durante la separación, posiblemente como consecuencia de la amplia distribución de tamaño presente en la dispersión de las TeNPs**. Todos estos fenómenos, han impedido obtener información precisa de las características singulares de las nanopartículas sintetizadas.

A consecuencia de los malos resultados obtenidos en la separación por tamaños de las nanopartículas de la dispersión de TeNPs mediante AF⁴-ICP-MS, se recurrió a la técnica ICP-MS en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS). Empleando tiempos de adquisición de datos de 3 ms, y teniendo en cuenta la composición de las TeNPs determinadas mediante XRD, se obtuvo el histograma de distribución por tamaños. En este se observan **claramente tres grupos poblacionales dependiendo de la distribución de tamaños de las nanopartículas: 149-161 nm, 167-185 nm y 191-203 nm, siendo la media 176±70 nm**. Asimismo, la aparición de eventos de mayor intensidad también indicó la presencia de agregados. Por otra parte, el análisis mediante **SP-ICP-MS permitió calcular la concentración de las TeNPs en número de partícula cuyo valor fue de 12.9x10¹¹ partícula mL⁻¹**, dos veces mayor que el obtenido mediante NTA (5.8x10¹¹ particles mL⁻¹) pero dentro de un mismo orden de magnitud. Cabe destacar que es la primera vez que se aplica la metodología SP-ICP-MS para caracterizar este tipo de nanopartículas, de las que se dispone de una información muy escasa en la literatura científica.

Tras la síntesis y caracterización de las TeNPs, se evaluó su potencial de inhibir la formación de biopelículas y/o para eliminar biopelículas ya formadas. Para ello se emplearon tres bacterias modelo cuya presencia es frecuente en el ámbito de la industria alimentaria y en el área clínica: *P. aeruginosa* (Gram negativa), *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva). Para la consecución de este objetivo se hizo uso de las mismas técnicas que se han descrito para los estudios llevados a cabo con SeNPs.

En cuanto a los experimentos referentes a *P. aeruginosa*, los resultados obtenidos en los ensayos de tinción de la biomasa total con cristal violeta pusieron de manifiesto que **la exposición de las bacterias a concentraciones superiores a 25 mg Te L⁻¹ en forma de TeNPs provocaba una inhibición de la formación de la biopelícula del 80 %**. Esto supone una mayor capacidad de inhibición de estas nanopartículas con respecto a las SeNPs donde la inhibición se producía a concentraciones de exposición superiores. El efecto inhibitorio de las TeNPs fue más acusado en el caso de *E. coli*, ya que llegaba a ser hasta de un 70 % a un nivel de exposición de 5 mg Te L⁻¹. **En relación al porcentaje de eliminación de la biopelícula previamente formada, solo se pudo extraer información para concentraciones menores de 25 mg Te L⁻¹, lográndose una eliminación del 30 % del *biofilm* para ambas bacterias, cuando se añadía una concentración de TeNPs de 5 mg Te L⁻¹**. Cabe destacar la aparición de una coloración negra en los pocillos empleados para el ensayo a concentraciones superiores a 5 mg L⁻¹, lo que dificultaba las medidas de absorción dando lugar a resultados erróneos. Este cambio de coloración al incrementar la concentración de TeNPs fue atribuido **a la transformación de las TeNPs esféricas (dispersión blanca) a TeNPs con morfología en forma de varillas (dispersión negra)**. Esta variación de la morfología de las nanopartículas en los confines del *biofilm* puede atribuirse a un mecanismo de detoxificación empleado por las bacterias para reducir la toxicidad de estas partículas.

La aparición de la coloración negra en los dos tipos de ensayos (formación y eliminación) también fue observada en el caso de los experimentos desarrollados para la bacteria Gram positiva *S. aureus*, a las concentraciones más altas ensayadas, lo que dificultó la obtención de resultados concluyentes. En este caso, las TeNPs parecen tener una menor capacidad para inhibir la formación de la biopelículas y para eliminar la biopelícula ya formada en comparación con los ensayos llevados a cabo con las bacterias Gram negativas. **De hecho, solo se observó una reducción en la capacidad de formación de la biopelícula por *S. aureus* del 40 % en el intervalo de concentraciones entre 0.1-25 mg Te L⁻¹ y un porcentaje de eliminación del 20 %**.

Por otro lado, las imágenes adquiridas mediante CLSM, y tras ser tratadas por las herramientas informáticas correspondientes, pusieron de manifiesto que **las TeNPs originaban una alteración significativa en la estructura de la biopelícula a medida que la concentración de TeNPs se incrementaba, tanto en las especies Gram negativas, *P. aeruginosa* y *E. coli*, como en la Gram positiva, *S. aureus***. En todos los casos las biopelículas se disgregaron formando microagregados celulares, modificando la

arquitectura inicial de las mimas. Este efecto también se observó mediante análisis por SEM.

Por otra parte, la disrupción de la estructura de los *biofilm* también supuso la pérdida de entre el 80-100 % del biovolumen de la biopelícula formada por estas bacterias a una concentración de 125 mg Te L⁻¹ en forma de TeNPs, aunque el porcentaje de células viables se mantuvo constante independientemente de la concentración ensayada. En este caso, también se vio afectado el porcentaje de superficie colonizada, lo que sugiere la pérdida de adhesión de estas bacterias por la presencia de las TeNPs.

Según los resultados mostrados parece evidente **que las TeNPs tienen un impacto notable en biopelículas de patógenos comunes en la industria alimentaria y en el sector clínico como *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. La presencia de las TeNPs no solo inhibe la formación de la biopelículas sino que afecta significativamente a su estructura, lo que se traduce en la dispersión final de la misma debido a una menor eficiencia en la adhesión y colonización.** Además, el presente estudio ha puesto de manifiesto la importancia de emplear varias técnicas complementarias con el fin de obtener resultados fiables debido a la complejidad tanto de las biopelículas en sí como de su interacción con las nanopartículas.

Además de conocer el efecto de las TeNPs en los comportamientos coordinados desarrollados por las poblaciones bacterianas, también es interesante estudiar los procesos de acumulación y transformación de estas nanopartículas en las poblaciones planctónicas, es decir, cuando crecen en forma unicelular o libre. En este caso lo más común es llevar a cabo ensayos de acumulación, a partir de los cuales se puede obtener información del contenido medio del elemento constituyente de la nanopartícula por célula individual. Sin embargo, los métodos empleados para ello no tienen en cuenta la heterogeneidad de las poblaciones celulares. En consecuencia, los contenidos medios de acumulación de nanopartículas se estiman suponiendo que todas las células asimilan y procesan por igual las nanopartículas añadidas a los medios de cultivo.

En este sentido, **el uso combinado de la microscopía electrónica de transmisión, la difracción de rayos X y la técnica ICP-MS en modo de detección de células individuales ha hecho posible, por primera vez, estudiar los modelos de acumulación, localización y transformación morfológica de las TeNPs en células individuales de poblaciones planctónicas de *E. coli* y *S. aureus*.**

Tras la incubación de los cultivos bacterianos con diferentes concentraciones de TeNPs (0.5, 1 y 15 mg Te L⁻¹) se observó mediante TEM cambios morfológicos en las partículas. Estos cambios consistían en la transformación de las nanopartículas esféricas, inicialmente añadidas, en nanovarillas de Te como se había observado previamente con las mismas poblaciones bacterianas en forma de biopelícula. El tratamiento de las imágenes mediante el software informático ImageJ permitió establecer la longitud, anchura de las nanovarilla y el ratio anchura/longitud. **Las dimensiones de las nanovarillas observadas en los cultivos de *E. coli* fueron de 303±23 nm y 26±10 nm (largo y ancho, respectivamente) siendo el cociente entre estos valores de 12; y 267±129 nm de largo y 21±8 nm de ancho con un ratio anchura/longitud de 14 en el caso de los experimentos llevados a cabo con *S. aureus*.** Asimismo, los análisis mediante RX proporcionaron información sobre los cambios en la composición de las mismas. Los espectros de difracción mostraron picos correspondientes a la fase cúbica y monoclinica de telurio cristalino (4 %) y a la fase ortorrómbica de TeO₂ (96 %) en el caso de *E.coli*, y a la fase cúbica y romboédrica de telurio cristalino (1 %) y a la fase ortorrómbica de TeO₂ (99 %) en el caso de *S. aureus*.

Por otro lado, la fijación de los cultivos y el corte en secciones con la ayuda de un micrótopo permitió establecer la localización intracelular de las nanopartículas tras la asimilación por las poblaciones planctónicas bacterianas. **Las imágenes de TEM evidenciaron que algunas de las nanopartículas estaban adheridas a la pared bacteriana, mientras que otras eran capaces de atravesarla y localizarse en su interior.** Asimismo, se observó la presencia de vesículas como consecuencia de los procesos de endocitosis a través de los cuales se produce la internalización de estas partículas.

Una vez evaluados los cambios en la morfología y la composición de las TeNPs como consecuencia de su interacción con las poblaciones bacterianas, se estudió el perfil de asimilación por célula individual en las poblaciones bacterianas planctónicas, mediante el empleo de la técnica ICP-MS en modo de detección de células individuales (SC-ICP-MS). Esto fue posible gracias al empleo de un nebulizador concéntrico de alto rendimiento en combinación con una cámara de nebulización de consumo total. **Este dispositivo experimental permitió obtener porcentajes de eficiencia de nebulización próximos al 60 %, y que son mucho más elevados que los descritos hasta la fecha en la bibliografía que están entre un 1-30 %.** Asimismo, se monitorizó la señal de fósforo en los cultivos tratados con TeNPs mediante ICP-TQ-MS con el fin de determinar el número de células totales, es decir, tanto las que acumulan telurio como las que no. Este

seguimiento, junto con los datos obtenidos sobre el número de células en los cultivos bacterianos empleando citometría de flujo, hicieron posible establecer que, prácticamente, **el 74 % y el 85 % de las células presentes en los cultivos de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, alcanzaban el plasma tras la etapa de introducción de la muestra.** Esto avala la representatividad de los datos obtenidos, ya que se está analizando una gran parte de la población bacteriana, a diferencia de los experimentos que se realizan con TEM en los que el número de células que se estudian es muy pequeño, y por tanto, en ocasiones, poco representativos.

Los histogramas elaborados con los datos obtenidos por SC-ICP-MS, en los que se muestra el número de células que asimilan una determinada masa de telurio, demuestran la variabilidad con la que las células individuales de las poblaciones bacterianas acumulan las TeNPs. Por tanto, los resultados obtenidos corroboran que las células individuales que componen las poblaciones bacterianas no procesan por igual las TeNPs. Además, el número de células que acumulan este tipo de nanopartículas se incrementa en los dos tipos de cultivos bacterianos al aumentar la concentración de TeNPs inicial. Sin embargo, este aumento en el porcentaje de células que asimilan TeNPs también va acompañado de una disminución en la densidad celular, manifestado en el menor número de eventos de fósforo registrados a medida que aumenta la concentración de estas nanopartículas en el medio de cultivo. Este hecho sugiere que las TeNPs tienen un cierto efecto biocida sobre las poblaciones bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*.

Por otro lado, el test estadístico ANOVA, realizado a partir de todos los resultados obtenidos, no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la masa de telurio acumulada en ambas especies bacterianas a bajas concentraciones (0.5 y 1 mg Te L⁻¹) pero sí entre estas y la concentración más alta ensayada (15 mg Te L⁻¹). De la misma manera, también se encontraron diferencias significativas entre la masa de telurio acumulada por *E. coli* y la acumulada por *S. aureus* cuando se añadieron al medio de cultivo TeNPs a bajas concentraciones (0.5 y 1 mg Te L⁻¹).

Para validar la exactitud de la técnica SC-ICP-TQ-MS en la determinación de los niveles de telurio acumulado por célula individual, se llevó a cabo una digestión ácida de los cultivos tratados con TeNPs y se determinó el contenido medio de telurio acumulado por las poblaciones bacterianas mediante ICP-MS. La buena concordancia entre los datos obtenidos mediante los dos procedimientos experimentales utilizados (SC-ICP-MS o digestión ácida seguida de ICP-MS) evidenció que la técnica SC-ICP-MS es una herramienta

analítica adecuada para el estudio de los modelos de acumulación de TeNPs en células bacterianas individuales.

Para una mayor profundización en el conocimiento de los procesos de asimilación de estas nanopartículas por las dos bacterias modelo ensayadas, se determinó el número de partículas acumuladas por célula individual. Para ello se llevó a cabo mediante SP-ICP-MS la determinación del número de nanopartículas que estaban asociadas a la membrana o que se encontraban en el interior de las células. Previo a la medida de las nanopartículas, estas se aislaron de la pared bacteriana mediante la ruptura de la misma con bolas de vidrio de 500 μm de diámetro. **La medida de las nanopartículas mediante SP-ICP-MS puso de manifiesto que la bacteria *E. coli* acumulaba en su interior una media de 4 ± 1 , 7 ± 3 y 50 ± 36 partículas por célula en función de la concentración de TeNPs inicialmente añadida en los medios de cultivo, que fueron 0.5, 1 y 15 mg Te L^{-1} , respectivamente. Sin embargo, el número medio de partículas acumuladas por célula en el caso de *S. aureus* era ligeramente inferior, en el caso de la mayor concentración ensayada, probablemente debido a que esta bacteria tiene un tamaño menor que *E. coli*. De este modo, *S. aureus* acumuló 5 ± 2 , 9 ± 4 y 37 ± 27 partículas por célula cuando los cultivos fueron tratados con 0.5, 1 y 15 mg Te L^{-1} de TeNPs, respectivamente.** También cabe destacar que en ambos casos solo se encontraron células que acumulaban una única partícula cuando las células fueron expuestas a la menor concentración de TeNPs.

En este estudio también se llevó a cabo la caracterización en tamaño de las nanopartículas con forma de nanovarilla resultantes de los cambios morfológicos producidos en las nanopartículas esféricas por su interacción con las bacterias. Para ello se emplearon los datos obtenidos de TEM y los resultados procedentes del análisis mediante SP-ICP-MS de las nanopartículas extraídas tras la disrupción de las células bacterianas. Es importante puntualizar que para la estimación de las dimensiones de estas nanovarillas se consideró su volumen como el de un cilindro. De esta manera, lo primero que se llevó a cabo fue el cálculo del volumen asociado a las nanopartículas teniendo en cuenta la masa de telurio por partícula determinada mediante SP-ICP-MS, y la densidad de las partículas deducida de los datos obtenidos sobre su composición mediante RX. A continuación, se estimó la anchura y la longitud de las TeNPs a partir de la fórmula del volumen de un cilindro, con el volumen calculado en el paso anterior y teniendo en cuenta la relación anchura/longitud establecida a partir de las imágenes obtenidas por TEM.

Una vez más, los histogramas de distribución de tamaños para las dos dimensiones estudiadas (ancho y largo) mostraron **la gran variabilidad en los tamaños obtenidos tanto para la anchura como para la longitud de las nanovarillas de telurio**. Esto confirmaría la heterogeneidad en el comportamiento celular con respecto a la transformación morfológica y la acumulación de estas nanopartículas. Los datos de las dimensiones deducidos del procedimiento descrito, fueron comparados con aquellos obtenidos de la medida directa de la longitud y anchura de las nanovarillas presentes en las imágenes de TEM mediante software informático (ImageJ). En este sentido, el tamaño de las dos dimensiones estimadas a partir de estos dos procedimientos (SP-ICP-MS y TEM) fueron comparables cuando ambos cultivos habían sido expuestos a 15 mg Te L⁻¹ de TeNPs. Sin embargo, esta comparativa no se pudo establecer con los datos de los experimentos en los que estos niveles de exposición fueron más bajos, 0.5 y 1 mg Te L⁻¹, puesto que no fue posible obtener las dimensiones de las nanovarillas mediante TEM al ser la concentración demasiado baja para poder observar las nanopartículas mediante esta técnica. No obstante, **el esquema experimental que se ha propuesto (extracción de las nanopartículas y análisis mediante SP-ICP-MS) sí ha permitido obtener datos sobre las dimensiones de las nanovarillas a niveles bajos de exposición (0.5 y 1 mg Te L⁻¹)**, lo que ha permitido confirmar que estas nanovarillas son similares en anchura pero de longitud menor en comparación con las producidas por ambos cultivos tras la exposición a concentraciones de TeNPs superiores (15 mg Te L⁻¹).

Los resultados obtenidos evidencian la utilidad de la combinación **SP-ICP-MS y TEM para la caracterización de nanopartículas que se alejan de la esfericidad**. Hasta ahora, el empleo de SP-ICP-MS se había limitado prácticamente al estudio de nanopartículas comerciales, en su mayoría esféricas y de composición conocida. Sin embargo, se ha visto que también es una alternativa muy prometedora para establecer las propiedades de otro tipo de nanopartículas, cuyas características no son conocidas a priori debido a las transformaciones que pueden sufrir como consecuencia de las interacciones de estas con diferentes ecosistemas una vez que son liberadas al medio ambiente.

Por tanto, **el uso combinado de técnicas tan diferentes, pero complementarias, como TEM, difracción de rayos X y SC/SP-ICP-MS es de especial importancia para evaluar la acumulación, localización y transformación de las nanopartículas de telurio en células individuales de las poblaciones bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*.**

Para finalizar, es importante destacar que el estudio del efecto de las TeNPs sintetizadas a escala de laboratorio en especies bacterianas en función del modelo de crecimiento (planctónico o biopelícula) da una visión global y completa de la interacción de estas partículas con estos sistemas biológicos.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La complejidad de la caracterización inequívoca de las nanopartículas ha hecho necesario **el empleo de diferentes técnicas analíticas**, concretamente **técnicas de microscopía (TEM y SEM), técnicas basadas en la dispersión de luz (DLS y NTA), técnicas espectroscópicas (UV-Vis y FTIR), difracción de rayos X, técnicas de separación (ultrafiltración y AF⁴) e ICP-MS en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS)**. Algunas de las nanopartículas han sido sintetizadas en el laboratorio (ZnONPs, SeNPs y TeNPs) mientras que otras han sido adquiridas comercialmente (AgNPs y TiO₂NPs). En todos los casos se han desarrollado y aplicado con éxito metodologías analíticas para la caracterización de las nanopartículas mencionadas en muestras tan complejas como cultivos bacterianos, materiales plásticos, alimentos, extractos procedentes de digestiones gastrointestinales *in vitro*, etc.
2. Las dos cepas de bacterias del género *Lactobacillus*, *L. reuteri* CRL 1101 y *L. acidophilus* CRL 636, fueron capaces de acumular selenio, y biotransformar una gran parte de este en SeMet y SeCys. Sin embargo, ***L. reuteri* CRL 1101 presentó una mayor efectividad en estos procesos de transformación junto con una elevada resistencia a las condiciones fisiológicas que se dan en el tracto gastrointestinal**. Por todo ello, esta cepa bacteriana sería la más adecuada para la elaboración de productos fermentados enriquecidos en selenio o para ser administrada como probiótico enriquecido en este elemento esencial.
3. La estrategia de proteómica cuantitativa SILAC, junto con la espectrometría de masas (ESI-MS/MS), se ha aplicado por primera vez, y con éxito, para establecer las variaciones en la expresión de proteínas de la cepa *L. reuteri* CRL 1101 como consecuencia de su exposición a dos formas químicas de selenio. Los resultados obtenidos reflejan diferencias en el perfil de expresión proteica en *L. reuteri* CRL 1101 en función de la forma de selenio administrada, SeO₃²⁻ o SeNPs. Las dos formas químicas de selenio originaron **la sobreexpresión de proteínas directamente relacionadas con el metabolismo del selenio, en concreto, con la producción de selenoaminoácidos como SeCys y SeMet; la sobreexpresión de proteínas involucradas en la generación de exopolisacáridos; y la inhibición de aquellas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos**. Cabe destacar también la sobreexpresión de proteínas implicadas en la protección frente al estrés oxidativo, lo que demuestra el potencial de *L. reuteri* CRL

1101 enriquecido con selenio **como probiótico con capacidad antioxidante**. Por otro lado, la sobreexpresión de proteínas fágicas y chaperonas solo se observó en los ensayos llevados a cabo con selenito. Esto, sugiere que la **suplementación de selenio en forma de SeNPs tiene un efecto menos novico en los patrones de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101** y, por tanto, resulta menos tóxica para esta cepa bacteriana que el selenito.

4. La bioaccesibilidad de cinc en las fórmulas infantiles varió en función de su composición, encontrándose porcentajes de **cinc bioaccesible entre el 60-70 % en aquellas basadas en leche de vaca y solo del 30 % en la de soja. Sin embargo, los porcentajes de cinc biodisponibles fueron menores del 11 % en todos los casos**. Por el contrario, los análisis por SEC-ICP-MS de los extractos gastrointestinales revelaron que **el cinc se encontraba unido a moléculas de bajo peso molecular (0.1-7 kDa)**, lo suficientemente pequeñas para ser absorbidas por el intestino. Esto pone de manifiesto que el acoplamiento SEC-ICP-MS es una herramienta de gran utilidad, por un lado, como método complementario o de confirmación respecto a los modelos *in vitro* más tradicionales en los que se emplean membranas de diálisis como simuladoras de los procesos de absorción en el intestino y, por otro, para profundizar en los parámetros que afectan a la absorción de elementos esenciales como el cinc.

5. El desarrollo de envases activos empleando ZnONPs como agente activo puede mejorar las condiciones de almacenamiento del alimento, pero puede constituir un riesgo para el consumidor. La aplicación de dos técnicas diferentes pero complementarias, como SP-ICP-MS y TEM, ha puesto de manifiesto la fuerte influencia que tienen tanto el tipo de matriz alimentaria, como las condiciones fisiológicas de la digestión gastrointestinal en las propiedades de las ZnONPs migradas al alimento a través del envase. **El contacto entre las ZnONPs y las matrices alimentarias ensayadas (pollo o zumo de naranja) ocasionó una drástica disminución en su tamaño, de 80 nm a 11 nm**. Asimismo, los estudios de digestión gastrointestinal *in vitro*, evidenciaron que **estas nanopartículas pueden alcanzar las paredes del intestino en forma de agregados, de pequeñas partículas (< 3 nm), y/o en forma de iones disueltos, en función de la naturaleza de la matriz alimentaria a la que hayan migrado**.

6. Las elevadas concentraciones de Zn disuelto como consecuencia de la interacción de las ZnONPs con la matriz alimentaria, limitó la aplicabilidad la técnica SP-ICP-MS empleando tiempos de respuesta del orden de milisegundos. Esto hace que se obtengan LOD en tamaño muy elevados. Sin embargo, aún en estas condiciones, **se pudo**

establecer que el 72 % del cinc migrado a las muestras alimentarias se encontraba en forma de ZnONPs con tamaños inferiores a 95 nm. A pesar de estas limitaciones, la técnica SP-ICP-MS resulta muy adecuada como método de *screening* para detectar de forma rápida la migración de nanopartículas a los productos envasados.

7. Las nanopartículas metálicas (AgNPs, ZnONPs y TiO₂NPs) y de metaloides (SeNPs y TeNPs) alteraron significativamente los sistemas de comunicación QS mediados por AHLs, siendo este efecto dependiente tanto de las características físico-químicas de las partículas como de la concentración de las mismas. Estos resultados convierten a las nanopartículas ensayadas en una alternativa eficaz para combatir el desarrollo de biopelículas y, por ende, la aparición de infecciones persistentes. Sin embargo, también pone de manifiesto el riesgo que puede suponer para los sistemas naturales la liberación de estos nanomateriales.

8. La combinación de los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de QS, realizados con una cepa salvaje y una cepa mutante de *C. violaceum*, hizo posible esclarecer las etapas involucradas en el QS que se veían afectadas por la presencia de las nanopartículas. Los **resultados obtenidos parecen indicar que las ZnONPs y las TeNPs tienen un mayor impacto en la percepción de la señal y en el desencadenamiento de la respuesta, que en la propia síntesis de la señal de QS**. Por el contrario, las AgNPs, TiO₂NPs y SeNPs parecen afectar en mayor medida al proceso de biosíntesis del autoinductor que a los procesos relacionados con la percepción de la señal y su respuesta.

9. Las nanopartículas de SeNPs y TeNPs afectaron notablemente a la formación de biopelículas de patógenos comunes en la industria alimentaria, como *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. La presencia de las nanopartículas no solamente influyó en la formación de la biopelícula, sino que afectó significativamente a su estructura, lo que se tradujo **en una disminución del 90 % del biovolumen de la biopelícula y en la dispersión de la misma**. Los resultados manifiestan el potencial que presentan estas nanopartículas para su empleo como agentes preventivos de la formación de biopelículas en superficies presentes tanto en el sector alimentario como clínico.

10. Se ha demostrado que la técnica ICP-MS en modo de detección de células individuales (SC-ICP-MS) permite obtener datos precisos y fiables de los perfiles de acumulación de nanopartículas de telurio en células individuales de poblaciones bacterianas. En concreto, se ha podido determinar la masa de telurio y el número de

partículas acumuladas por célula individual en cultivos de *E. coli* y *S. aureus*. Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de acumulación de ambas especies bacterianas y se pudo demostrar la gran heterogeneidad entre las células individuales que componen las poblaciones bacterianas en relación a la acumulación de TeNPs. La técnica SC-ICP-MS proporciona información relevante para el estudio del comportamiento de las nanopartículas en estos sistemas biológicos.

11. La interacción de las TeNPs con bacterias como *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*, provocó cambios morfológicos en las nanopartículas, desde la forma esférica original a nanovarillas. **La caracterización dimensional (anchura y longitud) de las nanovarillas resultantes fue posible gracias al uso combinado de las técnicas SP-ICP-MS, difracción de rayos X y TEM.** Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la técnica SP-ICP-MS, no solo para la caracterización de nanopartículas de morfología esférica, sino para estudiar los cambios morfológicos que se producen en las mismas como consecuencia de su interacción con sistemas biológicos.

CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the results obtained in this Doctoral Thesis:

1. Nanoparticles characterization is not an easy task and requires **the combined used of different analytical techniques in a complementary way, such as electron microscopy (TEM and SEM), light scattering techniques (DLS and NTA) spectroscopy techniques (UV-Vis and FTIR), X-ray diffraction, separation techniques (ultrafiltration and AF⁴) and ICP-MS in single particle mode (SP-ICP-MS)**. Some of the nanoparticles employed have been successfully synthesized in the laboratory (ZnONPs, SeNPs and TeNPs), while others have been commercially acquired (AgNPs and TiO₂NPs). However, in all cases, analytical methodologies have been developed and successfully applied for the characterization of these nanoparticles in complex samples such as bacterial cultures, plastic materials, food or extracts from *in vitro* gastrointestinal digestion processes.
2. The two *Lactobacillus* strains tested, *L. reuteri* CRL 1101 and *L. acidophilus* CRL 636, were able to accumulate and biotransform Se mainly into SeMet and SeCys. However, ***L. reuteri* CRL 1101 showed the highest effectiveness in producing SeMet and SeCys together with a high resistance to the physiological conditions that occur in the gastrointestinal tract**. Therefore, this Se-enriched strain could be considered as suitable to be administrated as probiotics or to be used for formulating fermented products containing Se-enriched bacteria.
3. The quantitative proteomic SILAC approach together with mass spectrometry (ESI-MS/MS) were successfully applied for the first time to evaluate the effect of different chemical forms of Se (SeO₃²⁻ o SeNPs) on *L. reuteri* CRL 1101 protein expression. The results showed differences on protein expression between the selenium species supplemented (selenite or SeNPs). **Both species originated the overexpression of proteins directly related to selenium metabolism, specifically on the production of selenoaminoacids such as SeCys and SeMet; the overexpression of proteins involved in exopolysaccharide synthesis; and the inhibition of those related to carbohydrate and lipid metabolism**. It is also noteworthy the overexpression of proteins involved in protection against oxidative stress, which demonstrates the potential of selenium-enriched *L. reuteri* CRL 1101 as a probiotic with antioxidant capacity. On the other hand, overexpression of phage proteins and chaperones (response factor against stress conditions) were observed only when selenite was added to the

culture medium. This fact suggests that selenium supplementation as SeNPs produced a less deleterious effect on *L. reuteri* CRL 1101 than selenite.

4. Zn bioaccessibility in infant formula varied according to their composition and **ranged from 60 to 70 % when formulations were manufactured from cow milk; whereas values as low as 23 % were obtained when soy-based infant formula was evaluated. However, the percentages of bioavailable Zn were lower than 11 % in all cases.** In spite of this, SEC-ICP-MS analysis of gastrointestinal extracts revealed that **Zn was associated with low-molecular-weight proteins (0.1-7 kDa)**, which are small enough to be absorbed by the intestine walls. This suggests SEC-ICP-MS as a powerful analytical tool to confirm results from *in vitro* method, such as dialysis, for measuring bioavailability.

5. The development of food active packaging containing ZnONPs as antimicrobial agent may increase the shelf life of food products, but it may represent a risk for the consumer. The combination of SP-ICP-MS and TEM evidenced the strong influence of the food matrix and the physiological conditions of gastrointestinal digestions on the fate and behaviour of ZnONPs released from food contact materials. **The interaction between ZnONPs and food matrices (chicken breast and orange juice) produced an important decrease in particle size, from 80 nm to 11 nm.** Likewise, results from *in vitro* gastrointestinal digestion procedures showed that **ZnONPs may reach the intestine walls as aggregates, as small particles (< 3 nm), and/or as ionic zinc depending on the food matrix.**

6. The presence of high levels of dissolved zinc in samples as consequence of nanoparticle-food matrix interaction seriously hampers the performance of SP-ICP-MS measurements using millisecond as dwell time, and notably worsens the LOD size. However, even under these conditions, it could be established that a **72 % of ZnONPs migrated to food samples was below 95 nm. In spite of these limitations, SP-ICP-MS results a suitable screening method to detect nanoparticles migration from packaging to food.**

7. **Metal (AgNPs, ZnONPs and TiO₂NPs) and metalloid (SeNPs and TeNPs) based nanoparticles significantly disturbed AHL-mediated QS systems**, being this effect dependent on the nature and the concentration of the nanoparticle tested. This finding suggests nanoparticles as potential alternatives to fight against biofilm development and thus against bacterial persistent infections. Moreover, the results obtained also highlight the serious problem that the release of nanoparticles could originate in the environment.

8. The results obtained in the QS inhibition assays by the combination of two strains of *C. violaceum* (a wild type and a mutant strain) have allowed us to determine the effect of nanoparticles in the different steps involved in the AHL regulated QS system. **ZnONPs and TeNPs mainly disturb the processes related to signal perception and response rather than those linked with the synthesis of the QS signal, whereas AgNPs, TiO₂NPs and SeNPs affect in a greater extent the biosynthesis of the QS signal than the disruption of this signal perception and response in the QS system.**

9. **SeNPs and TeNPs had a significant effect on the biofilm developed by pathogens commonly found in food industry such as *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus*.** These nanoparticles not only inhibited biofilm formation, but also affected biofilm structure, producing a reduction of 90 % of biofilm biovolume and biofilm dispersion. The results suggest that SeNPs and TeNPs could be considered as alternative agents to prevent biofilm formation on surfaces from both food and clinical sectors.

10. Single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS) analysis provided accurate and reliable data on the accumulation profiles of TeNPs at single cell level in two different bacterial populations. **The mass and number of nanoparticles accumulated in planktonic individual cells of *S. aureus* and *E. coli* has been successfully determined. Significant differences between the accumulation profiles of both bacterial species were found. Moreover, the existence of a great cell to cell variability in terms of TeNPs accumulated was also confirmed.** Therefore, SC-ICP-MS led us to get reliable information about nanoparticle behaviour within these biological systems.

11. **The occurrence of compositional and morphological changes (from nanospheres to nanorods) of TeNPs as a result of their interaction with *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* bacterial populations has been confirmed.** Moreover, **the application of SP-ICP-MS, together with X-ray diffraction and TEM analysis, has enabled to perform the dimensional characterization of the rod-shaped TeNPs.** The results evidenced the feasibility of SP-ICP-MS not only to characterize sphere-shaped nanoparticle, but also to study the morphological changes that may occur as a result of the interaction between nanoparticles and biological systems.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Alvaro, I., Peña-Vazquez, E., Bolea, E., Bermejo-Barrera, P., Castillo, J.R., Laborda, F. Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408, 5089-5097.
- Abbas, K.A., Saleh, A.M., Mohamed, A., MohdAzhan, N. The recent advances in the nanotechnology and its applications in food processing: A review. *J. Food Agri. Environ.*, **2009**, 7 (3-4), 14-17.
- Abedini, M., Shariatmadari, F., Torshizi, M.A.K., Ahmadi, H. Effects of a dietary supplementation with zinc oxide nanoparticles, compared to zinc oxide and zinc methionine, on performance, egg quality and zinc status of laying hens. *Livest. Sci.*, **2017**, 203, 30-36.
- Adam, F.C. & Barbante Carlo. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, **2013**, 86, 3-13.
- Adam, V. & Vaculovicova, M. Capillary electrophoresis and nanomaterials – Part I: capillary electrophoresis of nanomaterials. *Electrophoresis*, **2017**, 38, 2389-2404.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M.H., Iqbal, Z. Role of selenium in male reproduction: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, **2014**, 146 (1-2), 55-62.
- Adawi, H.I., Newbold, M.A., Reed, J.M., Vance, M.E., Feitshans, I.L., Bickford, R.L., Lewinski, N.A. Nano-enabled personal care products: Current developments in consumer safety. *Nanoimpact*, **2018**, 11, 170-179.
- Adeyeye, S.A.O. & Fayemi, O.E. Nanotechnology and food processing: between innovations and consumer safety. *J. Culin. Sci. Technol.*, **2018**, 17 (5), 435-452.
- Aijuka, M. & Buys, E.M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: implications for food safety and public health. *Food Microbiol.*, **2019**, 82, 363-370.
- Alfthan, G., Euroola, M., Ekholm, P., Venäläinen, E.-R., Root, T., Korkalainen, K., Hietaniemi, V. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *J. Trace Element. Med. Biol.*, **2015**, 31, 142-147.

- Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., Abdel-Moneim, A.E. Anti-hyperglycemic activity of selenium nanoparticles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Nanomedicine*. **2015**,10, 6741–6756.
- Al-Shabib, N.A., Husain, F.M., Ahmed, F., Khan, R.A., Ahmad, I., Alsharaeh, E., Khan, M.S., Hussain, A., Rehman, M.T., Yusuf, M., Hassan, I., Khan, J.M., Ashraf, G.M., Alsalmeh, A., Al-Ajmi, M.F., Tarasov, V.V., Aliev, G. Biogenic synthesis of Zinc oxide nanostructures from *Nigella sativa* seed: Prospective role as food packaging material inhibiting broad-spectrum quorum sensing and biofilm. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 36761.
- Alvarez, M.V., Moreira, M.R., Ponce, A. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *J. Food Safety*, **2012**, 32(3).
- Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez-Conde, M.C., Gutiérrez, A.M., Cámara, C. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(18), 8728-36.
- Anan, Y., Yoshida, M., Hasegawa, S., Katai, R., Tokumoto, M., Ouerdane, L., Łobiński, R., Ogra, Y. Speciation and identification of tellurium-containing metabolites in garlic, *Allium sativum*, *Metallomics*, **2013**, 5, 1215.
- Ansari, A.A., Kaushik, A., Solanki, P.R., Malhotra, B.D. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection. *Bioelectrochemistry*, **2010**, 77(2), 75-81.
- Arab, F., Mousavi-Kamazani, M., Salavati-Nisari, M. Synthesis, characterization, and optical properties of Te, Te/TeO₂ and TeO₂ nanostructure via one-pot hydrothermal method. *RSC Adv.*, **2016**, 6, 71472-71480.
- Arnér, E.S.J. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp. Cell Res.*, **2010**, 316(8), 1296-303.
- Artiaga, G., Ramos, K., Ramos, L., Camara, C., Gomez-Gómez, M. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS. *Food Chem.*, **2015**, 166, 76-85.
- Arunkumar, M., Suhashini, K., Mahesh, N., Ravikumar, R. Quorum quenching and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from *Sargassum polyphyllum*. *Bangladesh J. Pharmacol.*, **2014**, 9, 54-59.
- Aureli, F., Ouerdane, L., Bierla, K., Szpunar, J., Prakash, N.T., Cubadda, F. Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops. *Metallomics*, **2012**, 4, 968-978.

- Avery, J.C., Hoffmann, P.R. Selenium, selenoproteins and immunity. *Nutrients*, **2018**, 10(9), 1203.
- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., He'braud, M., Jaglic, M. Kac'a'niova', Z., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhaõ, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simoães, M., Tresse, O., Sternberg, C. Critical review on biofilm methods, *Crit.Rev.Microbiol.*, **2017**, 43, 313–351.
- Ba, L.A., Doring, M., Jamier, V., Jacob, C. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 8(19), 4203-16.
- Bai, Y., Wang, Y., Zhou, Y., Weijia, L., Wenjie, Z. Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase. *Mater.*, **2008**, 62(15), 2311–2314.
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 404 (4), 939–965.
- Beauchemin, D. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry methods. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, **2017**, 236-245.
- Bednar, A.J., Poda, A.R., Mitrano, D.M., Kennedy, A.J., Gray, E.P., Ranville, J.F., Hayes, C.A., Crocker, F.H., Steevens, J.A. Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials. *Talanta*, **2013**, 104, 140-148.
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.M. *Escherichia coli* biofilms. In: Romeo, T (Eds.). Bacterial biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immun.*, **2008**, 249-289.
- Bergin, I.L., Witzmann, F. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.*, **2013**, 3(1-2), 10.1504.
- Berenguel, O., Pessoa, G.S., Arruda, M.A.Z. Total content and *in vitro* bioaccessibility of tellurium in Brazil nuts. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, **2018**, 48, 46-51.
- B'Hymer, C., Caruso, J.A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1114 1-20.
- Biang, J., Govasmark, E., Szpunar, J. Characterization of selenium incorporation into wheat proteins by two-dimensional gel electrophoresis-laser ablation ICP-MS followed by capillary HPLC-ICP-MS and electrospray linear trap quadrupole Orbitrap MS. *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 2037-2043.

Bierla, K., Dernovics, M., Vacchina, V., Szpunar, J., Bertin, G., Lobinski, R. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390 (7), 1789-98.

Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* In: Vadillo, S., Piriz, S., Mateos, E. (Eds.), *Manual de Microbiología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, España, **2002**, 301-325.

Böhmert, L., Girod, M., Hansen, U., Maul R., Knappe, P., Niemann, B., Weidner, S. M., Thünemann, A.F., Lampen A. Analytically monitored digestion of silver nanoparticles and their toxicity on human intestinal cells. *Nanotoxicology*, **2014**; 8(6): 631-42.

Boyde, A. Confocal optical microscopy. Microscopy and analysis: New York: Springer Verlag, **1998**, 7-113.

Brar, S.K., Verma, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30, 4-17.

Breeuwer, P., Abee, T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.*, **2000**, 55(1-3), 193-200.

Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: and in vitro digestion method. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 526 51-61.

Cappitelli, F., Polo, A., Villa, F. Biofilm formation in food processing environment is still poorly understood and controlled. *Food Eng. Rev.*, **2014**, 6, 29-42.

Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., Vásquez, C.C. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanism of resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2009**, 33(4), 820-832.

Chhabria, S. & Desai, K. Selenium nanoparticles and their applications. *Encyclop. Nanosci. Nanotechnol.*, **2016**, 1-32. Edited by Nalwa, H.S. Publisher: American Scientific Publishers.

Chegoyen, Y. & Nerin, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 62, 16-22.

Chen, X., Yang, G., Chen, J., Wen, Z., Ge, K. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol. Trace Elem.*, **1980**, 2(2), 91-107.

- Chen, B., Zhnag, D., Wang, X., Ma, W., Deng, S., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., Liang, S. Proteomics progresses in microbial physiology and clinical antimicrobial therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2017**, 36(3), 403-413.
- Chiou, Y.D., Hsu, Y.J. Room-temperature synthesis of single-crystalline Se nanorods with remarkable photocatalytic properties. *Appl. Catal. B Environ.*, **2011**, 105, 211-9.
- Chowdhary, P.K., Keshavan, N., Nguyen, H.Q., Peterson, J.A., González, J.E., Haines, D. C. Bacillus mega- terium CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*, **2007**, 46, 14429-37.
- Combs, G.F. Selenium in global food systems. *Br. J. Nutr.*, **2001**, 85(5), 517-47.
- Constantinescu-Aruxandei, D., Frincu, R.M., Capra, L., Oancea, F. Selenium analysis and speciation in dietary supplements based on next-generation selenium ingredients. *Nutrients*, **2018**, 10, 1466.
- Contado, C. Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world”, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409, 2501-2518.
- Corte, M., Alvarez-Fernandez, R., Blanco, E., Bettmer, J., Montes-Bayón, M. Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS). *Anal. Chem.*, **2017**, 89, 11491-11497.
- Costerton, J.W. Introduction to biofilm. *Int. J. Antmicrob. Agents*, **1999**, 11, 217-221.
- Cubada, F., Aureli, F., Ciardullo, S., DÁmato, M., Raggi, A., Acharya, R., Reddy, R. A. V., Prakash, N.T. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentration of selenium in wheat grain. *J. Agr. Food Chem*, **2010**, 58, 2295-2301.
- Cuderman, P., Stibilj, V. How critical is the use of commercially available enzymes for selenium speciation? *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 393 (3), 1007-1013.
- Cunha, R.L., Gouvea, I.E., Juliano, L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An Acad. Bras. Cienc.*, **2009**, 81, 393-407.
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., Cummins, E. Nanotechnologies in the food industry-Recent developments, risks and regulations. *Trends Food Sci. Tech.*, **2012**, 24, 30-46.

De la Calle, I., Menta, M., Seby, F. Current trends and challenges in sample preparation for metallic nanoparticles analysis in daily products and environmental samples: A review. *Spectrochim. Acta B*, **2016**, 125, 66-96.

De la Calle, I., Menta, M., Klein, M., Séby. Study of the presence of micro-and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques. *Food Chem.*, **2018**, 266, 133-145.

Deguelldre, C. & Favarger, P.Y. Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **2003**, 217, 137-142.

Deguelldre, C. & Favarger, P.Y. Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Talanta*, **2004**, 62, 1051-4.

Deguelldre, C. & Favarger, P., Wold, S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode, *Anal. Chim. Acta.*, **2006**, 555, 263-268.

Dhanjal, S., Cameotra, S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb Cell Factories*, **2010**, 9, 52.

Dobias, J., Suvorova, E.I. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology*, **2011**, 22, 195605.

Dongn, Y.H., Wang, L.H., Zhang, L.H. Quorum-quenching microbial infections: mechanism and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **2007**, 362, 1201-1211.

Dou, H., Lee, Y.J., Jung, E.C., Lee, B.C., Lee, S. Study on steric transition in asymmetrical flow field-flow fractionation and application to characterization of high-energy material. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 130, 211-219.

Du, J., Sing, H., Dong, W., Bai, Y.H., Yi, T.H. Colorimetric detection of *Listeria monocytogenes* using one-pot biosynthesized flower-shaped gold nanoparticles. *Sens. Act. B Chem.*, **2018**, 265, 285-92.

Dudefoi, W., Moniz, K., Allen-Vercoe, E., Ropers, M.H., Walker, V.K. Impact of food grade and nano-TiO₂ particles on a human intestinal community. *Food Chem. Toxicol.*, **2017**, 106(Pt A), 242-249.

Duran, N., Justo, G.Z., Duran, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G.R., Nakazato, G. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-its main secondary metabolite: A review. *Biotechnol. Adv.*, **2016**, 34(5), 1030-1045.

Dwivedi, S., Alkhedhairi, A., Ahamed, M., Musarrat, J. Biomimetic synthesis of selenium nanospheres by bacterial strain JS-11 and its role as a biosensor for nanotoxicity assessment: a novel Se-bioassay. *PLoS One*, **2013**, 8, 1–10.

Estevez, H., Garcia-Lindon, J.C., Luque-Garcia, J.L., Camara C. Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2014**, 122, 184–193.

Etcheverry, P., Grusak, M.A., Fleige, L.E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D and E. *Front., Pysiol.*, **2012**, 3, 317.

Evivie, S.E., Huo, G.C., Igene, J.O., Bian, X. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *J. Food Nutr Res.*, **2017**, 61 1318034.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on Se-methyl-L-selenocysteine added as a source of selenium for nutritional purposes to food supplements. *EFSA J.*, **2009**, 1067, 1-23.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on dietary reference values for zinc. *EFSA J.*, **2014**, 12 (10), 3844.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E174) as food additive. *EFSA J.*, **2016a**, 14(1), 4364.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E171) as food additive. *EFSA J.*, **2016b**, 14(9), 4545.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the re-evaluation of silicon dioxide (E551) as a food additive. *EFSA J.*, **2018a**, 14(1), 4364.

European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on risk assessment of the nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA J.*, **2018b**, 16(7), 5327.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on assessment of the active substance selenium nanoparticles, for use in active food contact materials. *EFSA J.*, **2018c**, 16(1), 5115.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the proposed amendment of the EU specifications for titanium dioxide (E 171) with respect to the inclusion of additional parameters related to its particle size distribution. *EFSA J.*, **2019**, 17(7), 5760.

European Union (EU). REGULATION (EC) No 1333/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on food additives. *Off J Eur Union*, **2008**, L 354/16.

European Union (EU). COMMISSION REGULATION (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Off. J. Eur. Union*, **2009**, L 135/3.

European Union (EU). COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 of the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Off. J. Eur. Union*, **2011a**, L 275/38.

European Union (EU). COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off. J. Eur. Union*, **2011b**, L 12/1.

European Union (EU). COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011 OF 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Off. J. Eur. Union*, **2011c**, L295/1.

European Union (EU). REGULATION (EU) No 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Off. J. Eur. Union*, **2011d**, L 304/18.

European Union (EU). REGULATION (EU) 2015/2283 of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001. *Off. J. Eur. Union*, **2015**, L 327/11.

European Union (EU). COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2017/2470 of 20 December 2017 establishing the Union list of novel foods in accordance with Regulation

(EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Off. J. Eur. Union*, **2017**, L 351/72.

Fabricius, A.L., Duester, L., Meermann, B., Ternes, T.A. ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles-sample preparation and off-line fractionation strategies. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(2), 467-479.

Fernandes, A.P., Gandin, V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.*, **2015**, 1850 (8), 1642-1660.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.*, **2009**, 29, 751-760.

Figuerola, M., Fernandez, V., Arenas-Salinas, M., Ahumada, D., Muñoz-Villagrán, C., Cornejo, F., Vargas, E. Latorre, M., Morales, E., Vásquez, C., Arenas, F. Synthesis and antibacterial activity of metal(loid) nanostructures by environmental multi-metal(loid) resistant bacteria and metal(loid)-reducing flavoproteins. *Front. Microbiol.*, **2018**, 15(9), 959.

Friedman, M. & Juneja, V.K. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosan in food. *J. Food Prot.*, **2010**, 73(9), 1737-61.

Fuqua, C., Greenberg, E.P. Listening on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3, 685-695.

Fuertes, G., Soto, I., Carrasco, R., Vargas, M., Sabattin, J., Lagos, C. Intelligent packaging systems: sensors and nanosensors to monitor food quality and safety. *J. Sens.*, **2016**, 2, 1-8.

Galano, E., Mangiapane, E., Bianga, J., Palmese, A., Pessione, E., Szpunar, J., Lobinski, R., Amoresano, A. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, **2013**, 12, 2196-2204.

Gallego-Urrea, J.A., Tuoriniemi, J., Hasselov, M. Applications of particle tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30, 473-483.

Garret, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progr. Nat. Sci.*, **2008**, 18, 1049-1056.

Ghanbarzadeh, B., Oleyaei, S.A., Almasi, H. Nanostructured materials utilized in biopolymer-based plastics for food packaging applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2015**, 55(12), 1699-723.

Granclement, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2016**, 40, 86-116.

Geiser, M., Kreyling, W. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.*, **2010**, 7, 2.

Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 690-6945.

Goenaga-Infante, H., O'Connor, G., Rayman, M., Cook K. Simultaneous identification of selenium-containing glutathione species in selenised yeast by on-line HPLC with ICP-MS and electrospray ionisation quadrupole time of flight (QTOF)-MS/MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2006**, 21, 1256-1263.

Goff, J. & Yee, N. Tellurate enters Escherichia coli K-12 cells via the SulT-type sulfate transporter CysPUWA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2017**, 364(24).

Grombe, R., Charoud-Got, J., Emteborg, H., Linsinger, T.P.J., Seghers, J., Wagner, S., Von der Kammer, F., Hofmann, T. dudkiewicz, A., Llinas, M., Solans, C., Lehner, A., Allmaier, G. Production of reference materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, 405, 8185-95.

Guan, B., Yan, R., Li, R., Zhang, X. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *Int. J. Nanomedicine*, **2018**, 13, 7473-7490.

Guerra, A., Etienne-mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.*, **2012**, 30 (11), 591-600.

Hadri, H.E., Hackley, V.A. Investigation of cloud point extraction for the analysis of metallic nanoparticles in a soil matrix. *Environ. Sci. Nano*, **2017**, 4(1), 105-116.

Hagendorfer, H., Kaegi, R., Parlinska, M., 2012. Characterization of silver nanoparticle products using asymmetric flow field flow fractionation with a multidetector approach – a comparison to transmission electron microscopy and batch dynamic light scattering. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(6), 2678–2685.

Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Jimenez de Aberasturi, D., Ruiz, I., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.*, **2010**, 30(10), 499-511.

- Hanley, T.A, Saadawi, R., Zhang, P., Caruso, J.A., Landero-Figueroa. . Separation of silver ions and starch modified silver nanoparticles using high performance liquid chromatography with ultraviolet and inductively coupled mass spectrometric detection. *Spectrochim. Acta B*, **2014**, 100, 173-179.
- Hanlon, M. New fruit label indicates ripeness. New atlas, 2005. <https://newatlas.com/new-fruit-label-indicates-ripeness/3575/>.
- Harmaza, Y. H. & Slobozhanina, E.I. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects. *Biophysics*, **2014**, 59, 264–275.
- Hassan, M. Zinc oxide nanoparticles fortified biscuits as a nutritional supplement for zinc deficient rats. *J. Nanomed. Res.*, **2016**, 4(2), 81-88.
- Hatfield, D.L., Yoo, M.H., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N. Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, 1790, 151-1545.
- Hatfield, D.L., Tsuji, P.A., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N. Selenium and selenocysteine: role in cancer, health, and development. *Trends Biochem. Sci.*, **2014**, 39 (3), 112-120.
- Häffner, S.M., Malmsten, M. Membrane interactions and antimicrobial effects of inorganic nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2017**, 248, 105-128.
- Hazan, R., Que, Y.A., Maura, D., Rahme, L.G. A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiol.* , **2012**, 12, 259.
- Helfrich, A., Bettmer, J. Analysis of gold nanoparticles using ICP-MS based hyphenated and complementary ESI-MS techniques. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, 307(1-3), 92-98.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M., Gavara, R. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biol. Technol.*, **2006**, 39(3): 247-53.
- Hetzer, B., Burcza, A., Gräf, V., Walz, E., Greiner, R. Online-coupling of AF4 and single particle-ICP-MS as an analytical approach for the selective detection of nanosilver release from model food packaging films into food simulants. *Food Control*, **2017**, 80, 113-124.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2010**, 35, 322-332.
- Hori, K., Matsumoto, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochem., Eng. J.*, **2010**, 48, 424-434.

- Huang, Y., He, L., Liu, W., Fan, C., Zheng, W., Wong, Y.S., Chen, T. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*, **2013**, 34(29), 7106–16.
- Huang, W., Wu, H., Li, X., Chen, T. Facile one-pot synthesis of tellurium nanorods as antioxidant and anticancer agents. *Chem. Asian J.*, **2016**, 11(16), 2301-11.
- Ikuma, K., Decho, A.W., Lau, B.L.T. When nanoparticles meet biofilms-interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 591.
- Ilk, S., Saglam, N., Ozgen, M., Korkusuz, F. Chitosan nanoparticles enhances the anti-quorum sensing activity of kaempferol. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 9, 653-662.
- Jackson, B., Liba, A., Nelson, J. Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in food. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**.
- Jafarzadeh, S., Ariffin, F., Mahmud, S., Alias, A.K., Hosseini, S.F., Ahmad, M. Improving the physical and protective functions of semolina films by embedding a blend nanofillers (ZnO-nr and nano-kaolin). *Food Packag. Shelf Life*, **2017**, 12, 66-75.
- Jain, A., Ranjan, S., Dasgupta, N., Ramalingam, C. Nanomaterials in food and agriculture: An Overview on their safety concerns and regulatory issues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2018**, 58 (2), 297-317.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.*, **2018**, 81, 7-11.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanopart. Res.*, **2009**, 11, 77–89.
- Jimenez-Lamana, J., Abad-Alvaro, I., Bierla, K., Laborda, F., Szpunar, J., Lobinski, R. Detection and characterization of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeast by single particle ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2018**, 33, 452-460.
- Jing-Fu, L., Jing-bo, C., Liu, R., Zhi-qiang, T., Yong-guang, Y., Yuan, W., Gui-bin, J. Cloud Point extraction as an advantageous preconcentration approach for analysis of trace silver nanoparticles in environmental waters. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(15), 6496-6502.

- Jing-Fu, L., Su-juan, Y., Yong-guang, Y., Jing-bo, C. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2012**, 33, 95–106.
- Jou, N.T., Yoshimori, R.B., Mason, G.R., Louise, J.S., Liebling, M.G. Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, 35(5), 1161-1165.
- Kazempour, Z., Hossein, M., Yazdi, F., Shahverdi, A. Sub-inhibitory concentration of biogenic selenium nanoparticles lacks post antifungal effect for *Aspergillus niger* and *Candida albicans* and stimulates the growth of *Aspergillus niger*. *Iranian J. Microbiol.*, **2013**, 5, 81–85.
- Khajavi, M.Z., Mohammadi, R., Ahmadi, S., Farhoodi, M., Yousefi, M. Strategies for controlling release of plastic compounds into foodstuffs based on application of nanoparticles and its potential health issues. *Trends Food Sci. Technol.*, **2019**, 90, 1-12.
- Khezerlou, A., Alizadeh-Sani, M., Azizi-lalabadi, M., Ehsani, A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microb. Pathog.*, **2018**, 123, 505-526.
- Khiralla, G.M., El-Deeb, B.A. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2015**, 63 (2), 1001-1007.
- Khurana, A., Tekula, S., Saifi, M.A., Venkatesh, P., Godugu, C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.*, **2019**, 111, 802-812.
- Kieliszek, M. & Blazejak, S. Selenium: significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, **2013**, 29, 713–8.
- Kim, Y.B., Yang, J.S., Moon, M.H. Investigation of steric transition with field programming in frit inlet asymmetrical flow field-flow fractionation. *J. Chromatogr A*, **2018**, 1576, 131-136.
- Kipp, A.P., Strohm, D., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, L., Bechthold, A., Leschik-Bonnet, E., Hesecker, H., German Nutrition Society (DGE). Revised reference values for selenium intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2015**, 32, 195-199.
- Klapetek, P., Valtr, M., Necas, D., Salyk, O., Dzik, P. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions. *Nanoscale Res. Lett.*, **2011**, 6(1), 514.

- Kousha, M., Yeganeh, S., Amirkolaie, A.K. Effect of sodium selenite on the bacteria growth, selenium accumulation, and selenium biotransformation in *Pediococcus acidilactici*. *Food Sci. Biotechnol.*, **2017**, 26(4) 1013-1018.
- Kranz, C., Mizaikoff, B. Microscopic techniques for the characterization of gold nanoparticles. *Compr. Anal. Chem.*, **2014**, 66, 257-259.
- Kreyling, W.G., Abdelmonem, A.M., Ali, Z., Alves, F., Geiser, M., Haberl, N., Hartmann, R., Hirn, S., Jimenez de Aberasturi, D., Kanter, K., Khadem-Saba, G., Montenegro, J.M., Rejman, J., Rojo, T., Ruiz de Larramendi, I., Ufartes, R., Wenk, A., Parak, W.J. In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.*, **2015**, 10, 619-623.
- Krueger, K.M., Al-Somali, A.M., Falkner, J.C., Colvin, V.L. Characterization of nanocrystalline CdSe by size exclusion chromatography. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 3511-3515.
- Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., Nalwa, H.S. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceram. Int.*, **2017**, 43, 3940-3961.
- Kumar, S.S.D., Rajendran, N.K., Houreld, N.N., Abrahamse, H. Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 115, 165-175.
- Laborda, F., Jiménez-Lamana, J., Bolea, E., Castillo, J.R. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentration, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2013**, 28, 1220.
- Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 2270-8.
- Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.*, **2016a**, 9, 15- 23.
- Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M.T., Jiménez, M.S., Pérez-Arantegui, J., Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal. Chim. Acta.*, **2016b**, 904, 10-32.
- Lamberti, C., Mangiapane, E., Pessione, A., Mazzoli, R., Giunta, C., Pessione, E. Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb26 BM for nutraceutical applications. *Proteomics*, **2011**, 11, 2212-2221.

- Lampis, S., Zonaro, E., Bertolini, C., Bernardi, P., Butler, C., Vallini, G. Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. *Microb. Cell Factories*, **2014**, 13, 35.
- Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J.J., Croteau, M.N., Handy, R. D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects-An updated review. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2018**, 37(8), 2020-2063.
- Lefebvre, D.E., Venema, K., Gombau, L., Valerio, L.G., Raju, J., Bondy, G.S., Bouwmeester, H., Singh, R.P., Clippinger, A.J., Collnot, E.V., Mehta, R., Stone, V. Utility of model of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices. *Nanotoxicology*, **2015**, 9(4) ,5234-42.
- Li, Q., Chen, T., Yang, F., Liu, J., Zheng, W. Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine. *Mater.*, **2010**, 64(5), 614–617.
- Li, W., Zhang, C., Chi, H., Li, L., Lan, T., Han P., Chen, H., Qin, Y. Development of antimicrobial packaging film made from Poly(Lactic Acid) incorporating titanium dioxide and silver nanoparticles. *Molecules*, **2017**, 22(7), E1170.
- Liang, T., Guan, R., Tao, M., Lyu, F., Cao, G., Liu, M., Gao, J. In Vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles from food additives in human gastric epithelium (GES-1) cells. *Sci. Adv. Mat.*, **2017**, 9(8), 1393-1400.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J.Y., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., Zhang, L.H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* **2003**,47,849–60.
- Lim, S., Gunasekaran, S., Imm, J.Y. Gelatin-templated gold nanoparticles as novel time-temperature indicator. *J. Food Sci.*, **2012**, 77(9), N45-9.
- Lister, J.L. & Horswill, A.R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Inf. Mi.*, **2014**, 4(178), 1-9.
- Liu, J.M., Hu, Y., Yang, Y.K., Liu, H., Guo-Zhen, F., Xiaonan, L., Wang, S. Emerging functional nanomaterials for the detection of food contaminants. *Trends Food Sci. Technol.*, **2018**, 71, 94-106.
- Liu, Z., Xue, A., Chen, H., Li, S. Quantitative determination of trace metals in single yeast by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**, 103, 1475-1483.

Loef, M., Schrauzer, G.N., Walach, H. Selenium and Alzheimer's disease: a systematic review. *J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 26(1), 81-104.

Loeschner, K., Navratilova, J., Købler, C., Mølhave, K., Wagner, S., von der Kammer, F., Larsen, E.H. Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013a**, 405(25), 8185-95.

Loeschner, K., Navratilova, J., Legros, S., Wagner, S., Grombe, R., Snell, J., Von der Kammer, F., Larsen, E.H. Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of silver nanoparticles. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1272, 116-125.

López-Heras, I., Palomo, M., Madrid, Y. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 400, 1717-1727.

López-Heras, I., Sanchez-Diaz, R., Anunciação, D.S., Madrid, Y., Luque-Garcia, J.L. Effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell cycle arrest and invasiveness in hepatocarcinoma cells revealed by quantitative proteomics. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2014a**, 5(5), 1000225.

López-Heras, I., Madrid, Y., Cámara, C. Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field- flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, **2014b**, 124, 71-78.

Lopez-Sanz, S., Guzman, F.J., Rodríguez, R.C., Ríos, A. Analytical metrology for nanomaterials: present achievements and future challenges. *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1059, 1-15.

Lopez-Serrano, A., Baumgart, S., Bremser, W., Fleming, S., Wittke, D., Grutzkau, A., Luch, A., Haase, A., Jakubowski, N. Quantification of silver nanoparticles up-taken by single cells using inductively coupled plasma mass spectrometry in the single cell measurement mode. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2018**, 33, 1256-1263.

Lum, T.S., Leung, K.S.Y. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2016**, 31, 1078-1088.

Lum, J.T.S. & Leung, K.S.Y. Quantifying silver nanoparticle association and elemental content in single cells using dual mass mode in quadrupole-based inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1061, 50-59.

- Malheiro, J., Simoes, M. Antimicrobial resistance of biofilms in medical devices. In: Deng, Y., Ly, W. *Biofilms and implantable medical Devices.: Infection and Control.*, **2017**, 97-113.
- Mangiapane, E., Lamberti, C., Pessione, A., Galano, E., Amoresano, A., Pessione, E. Selenium effects on the metabolism of a Se-metabolizing *Lactobacillus reuteri*: analysis of envelope-enriched and extracellular proteomes. *Mol. BioSyst.*, **2014**, 10, 1272–1280.
- Markus, A.A., Krystek, P., Tromp, P.C., Parsons, J.R., Roex, E.W.M., Voogt, P., Laane, R.W.P.M. Determination of metal-based nanoparticles in the river Dommel in the Netherlands via ultrafiltration, HR-ICP-MS and SEM. *Sci. Total Environ.*, **2018**, 631-632, 485-495.
- Marquina, D. & Santos, A. Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, **2010a**, 3(5), 39-55.
- Marquina, D. & Santos, A. Procesos biológicos regulados por *quórum sensing*. *Reduca (Biología), Serie Microbiología*, **2010b**, 3(5), 56-74.
- Marínez-Nistal, A., Sampedro, A., Matsuguchi, M. Introducción a la microscopía láser confocal. En: Sampedro A, de los Troyos JR, Martínez-Nistal A. (Eds). *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*, **1995**.
- Mavrikakis, E., Mavroudakakis, L., Lydadakis-Simantiris, N., Pergantis, S.A. Investigating the uptake of arsenate by *Chlamydonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using Single Cell ICP-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-MS. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(15), 9590-9598.
- McClements, D.J., Deloid, G., Pyrgiotakis, G., Shatkin, J.A., Xiao, H., Demokritou, P. The role of food matrix and gastrointestinal tract in the assessment of biological properties of ingested engineered nanomaterials (iENMs): State of the science and knowledge gaps. *NanoImpact*, **2016**, 3-4, 47-57.
- Mebert, A.M., Tuttolomondo, M.V., Echazú, M.I.A., Foglia, M.L., Alvarez, G.S., Vescina, M.C., Santo-Orihuela, P.L., Desimone, M.F. Nanoparticles and capillary electrophoresis: a marriage with environmental impact. *Electrophoresis*, **2016**, 37, 2196-2207.
- Medina, D., Tien-Streen, W., Zhang, B., Huang, X., Vernet, A., Nieto-Argüello, A., Cholula-Díaz, J.L., Martínez, L., Huttel, Y., Ijué, M., García-Martín, J.M., Webster, T.J. Citric juice-mediated synthesis of tellurium nanoparticles with antimicrobial and anticancer properties. *Green Chem.*, **2019**, 21, 1982-1998.

Meisterjahn, B., Neubauer, E., Von der Kammer, F., Hennecke, D., Hofmann, T. Asymmetrical flow-field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of gold nanoparticles in the presence of natural nanoparticles. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1372, 204-211.

Meisterjahn, B., Wagner, S., Von der Kammer, F., Hennecke, D., Hofmann, T. Silver and gold nanoparticle separation using asymmetrical flow-field flow fractionation: influence of run conditions and of particle and membrane charges. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1440, 150-159.

Merrifield, R.C., Stephan, C., Lead, J.R. Quantification of Au nanoparticles biouptake and distribution to freshwater algae using single-cell ICP-MS. *Environ. Sci. Technol.*, **2018**, 52, 2271-2277.

Merritt, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A. Growing and analyzing static biofilms, *Curr. Protoc. Microbiol.*, **2011**, 1, 1-18.

Meyer, S., Lopez-Serrano, A., Mitz, H., Jakubowski, N., Schwerdtle, T. Single-cell analysis by ICP-MS/MS as fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite. *Metallomics*, **2018**, 1073.

Mittal, A.K., Kumar, S., Banerjee, U.C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, 431, 194-9.

Monteiro, D.R., Gorup, L.F., Takamiya, A.S., Ruvollo-Filho, A.C., Camargo, E.R., Barbosa, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2009**, 34, 103-110.

Montes-Bayón, M., Yanes, E.G., Ponce de León, C., Jayasimhulu, K., Stalcup, A., Shann, J., Caruso, J.A. Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS detection: an approach for phytoremediation studies. *Anal. Chem.*, **2002**, 174(1), 107-13.

Moreno-Martin, G., Pescuma, M., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., Madrid, Y. Determination of size and mass-and number based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multi-method approach. *Anal. Chim. Acta.*, **2017a**, 992, 34-41.

Moreno-Martin, G., Sanz-Landaluze, J., Madrid, Y. Nanospeciation analysis using field flow fractionation. *Encyclop. Anal. Chem.*, **2017b**.

- Moreno-Martin, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y. In-vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants. *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1081 72-80.
- Moritz, M., Geszke-Moritz, M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem., Eng., J.*, **2013**, 228, 596-613.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., Ikeda, T. N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2008**, 279, 124-130.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R.M. Thanh, N.T.K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticles properties. *Nanoscale*, **2018**, 10, 12871.
- Mousavi-Kamazani, M., Rahmatolahzadeh, R., Shobeiri, S.A., Beshkar, F. Sonochemical synthesis, formation mechanism, and solar cell application of tellurium nanoparticles. *Ultrasonic-Sonochemistry*, **2017**, 39, 233-239.
- Mrvčić, J., Stanzer, D., Solić, E., Stehlik-Tomas, V. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: Opportunities for improving food safety and quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, 28, 2771-2782.
- Mrvacic, J., Butorac, A., Solic, E., Stanzer, D., Bacun-Druzina, V., Cindric, M., Stehlik-Tomas, V. Characterization of *Lactobacillus breis* L62 strain, highly tolerant to copper ions, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, 291, 75-85
- Mu, H., Tang, J., Liu, Q., Sun, C., Wang, T., Duan, J. Potent antibacterial nanoparticles against biofilm and intracellular bacteria. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 18877.
- Mwilu, S.K., El Badawy, A.M., Bradham, K., Nelson, C., Thomas, D., Scheckel, K.G., Tolaymat, T., Mal, L., Rogers, K.R. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. *Sci. Total Environ.*, **2013**, 447, 90-8.
- Nageswara-Rao, R., Talluri, M.V. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, 43(1), 1-13.
- Naik, K., Kowshik, M. Anti-quorum sensing activity of AgCl-TiO₂ nanoparticles with potential use as active food packaging material. *J. Appl. Microbiol.*, **2014**, 117, 972-983.

Navarro-Alarcon, M. & Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.*, **2008**, 400(1-3), 115–141.

Negro, R. Selenium and thyroid autoimmunity. *Biologics: Targets and Therapy*, **2008**, 2(2), 265–273.

Nesakumar, N., Thandavan, K., Sethuraman, S., Krishnan, U.M., Rayappan, J.B. An electrochemical biosensor with nanointerface for lactate detection based on lactate dehydrogenase immobilized on zinc oxide nanorods. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2014**, 414, 90–6.

Nguyen, V.K., Wonyoung, C., Ha, Y., Gu, Y., Lee, C., Park, J., Jang, G., Shin, C., Cho, S. Microbial tellurite reduction and production of elemental tellurium nanoparticles by novel bacteria isolated from wastewater. *J. Ind. Eng. Chem.*, **2019**, 78, 246–256.

Niedzielski, P., Rudnicka, M., Wachelka, M., Kozak, L., Rzany, M., Wozniak, M., Kaskow, Z. Selenium species in selenium fortified dietary supplements. *Food Chem.* **2016**, 190, 454–459.

Njoroge, J., Sperandio, V. Jamming bacterial communication: New approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Mol. Med.*, **2009**, 201–210.

Novak, S., Drobne, D., Valant, H., Pipan-Tkalec, Z., Pelicon, P., Vavpetic, P., Grlj, N., Falnoga, I., Mazej, D., Remskar, M. Cell membrane integrity and internalization of ingested TiO₂ nanoparticles by digestive gland cells of a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2012**, 31(5), 1083–1090.

Odzak, N., Kistler, D., Behra, R., Sigg, L. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environ. Pollut.*, **2014**, 191, 132–138.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. Stable isotope labelling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, **2002**, 1(5), 376–386.

Oun, A.A., Rhim, J.W. Carrageenan-based hydrogels and films: Effect of ZnO and CuO nanoparticles on the physical, mechanical, and antimicrobial properties. *Food Hydrocoll.*, **2017**, 67, 45–53.

Pace, H.E., Rogers, N.J., Jarolimek, C., Coleman, V.A., Higgins, C.P., Ranville, J.F., Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 9361–9.

- Palomo-Siguero, M., López-Heras, M.I., Cámara, C., Madrid, Y. Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed Radish (*Raphanus Sativus*). *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 1237-1244.
- Palomo-Siguero, M., Gutiérrez, A.M., Pérez-Conde, C., Madrid, Y. Effect of selenite and selenium nanoparticle on lactic bacteria: A multi-analytical study. *Microchem. J.*, **2016**, 126, 488-495.
- Palomo-Siguero, M., Vera, P., Echegoyen, Y., Nerin, C., Camara, C., Madrid, Y. Asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for sizing SeNPs for packaging applications. *Spectrochim. Acta B*, **2017a**, 132, 19-25.
- Palomo-siguero, M., Madrid, Y. Exploring the behaviour and metabolic transformations of SeNPs in exposed lactic acid bacteria. Effect of Nanoparticles coating agent. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017b**, 18, 1712.
- Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann. Ig.*, **2013**, 25.
- Pawley, J.B. Fundamental limits in confocal microscopy. En: James B. Pawley (Eds). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3^o ed. New York: Springer Verlag; **2006**, 1,5.
- Prateeksha, Singh, B.R., Shoeb, M., Sharma, S., Naqvi, A.H., Gupta, V.K., Singh B.N. Scaffold of selenium nanovectors and honey phytochemicals for inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm formation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2017**, 7, 93.
- Pedrero, Z. & Madrid, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, 634(2), 135–152.
- Peters, R., Kramer, E., Oomen, A.G., Herrera, Z.E., Oegema, G., Tromp, P., Fokkink, R., Rietveld, A., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Peijnenburg, A.A.C., Bouwmeester, H. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano*, **2012**, 6(3), 2441-51.
- Peters, R.J.B., Rivera, Z.H., van Bommel, G., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Bouwmeester, H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014a**, 406(16), 3875-85.

- Peters, R.J.B, Van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Marvin, H.J., Weigel, S., Tromp, P.C., Oomen, A.G., Rietveld, A.G., Bouwmeester, H. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.*, **2014b**, 62(27), 6285-93.
- Peters, R., Herrera-Rivera, Z., Undas, A., Lee, M., Marvin, H., Bouwmeester, H., Weigel, S. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 1274-1285.
- Pedrero, Z., Madrid, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 634 (2), 135-152.
- Pei, X., Xiao, Z., Liu, L., Wang, G., Tao, W., Wang, M., Zou, J. Leng, D. Effects of dietary zinc oxide nanoparticles supplementation on growth performance, zinc status, intestinal morphology, microflora population, and immune response in weaned pigs. *J. Sci. Food Agric.*, **2019**, 99, 1366-1374.
- Pettibone, J.M., Gigault, J., Hackley, V. Discriminating the states of matter in metallic nanoparticle transformations: What are we missing? *ACS Nano*, **2013**, 7(3), 2491-2499.
- Pitkanen, L., Striegel, A.M. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2016**, 80, 311-320.
- Pophaly, S.D., Poonam, Singh, P., Kumar, H., Tomar, S.K., Singh, R. Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 39, 135-145.
- Prasad, A.S. Essentiality and toxicity of zinc. *Scand. J. Work Environ. Health.*, **1993**, 1, 134-6.
- Prasad, A.S. Zinc in human health: and update. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, **1998**, 11, 63-87.
- Proulx, K., Wilkinson, K.J. Separation, detection and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environ. Chem.*, **2014**, 11, 392-401.
- Qu, H., Linder, S.W., Mudalige, T.K. Surface coating and matrix effect on the electrophoretic mobility of gold nanoparticles: a capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409, 979-988.

- Qu, H., Mudalige, T.K., Linder, S.W. Capillary electrophoresis/inductively coupled plasma-mass spectrometry: development and optimization of a high resolution analytical tool for the size-based characterization of nanomaterials in dietary supplements. *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 11620-11627.
- Raghunath, A. & Perumal, E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2017**, 49(2), 137-152.
- Rai, N., Rai, R., Kareenhalli, V. Quorum sensing biosensor. In book: Kalia, V.C. (Eds.) *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. Springer, India, **2015**.
- Rakcheev, D., Philippe, A., Schaumann, G.E. Hydrodynamic chromatography coupled with single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry for investigating nanoparticles agglomerates. *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 22, 10643-10647.
- Ramos, K., Ramos, L., Gomez-Gomez, M. Simultaneous characterisation of silver nanoparticles and determination of dissolved silver in chicken meat subjected to in vitro human gastrointestinal digestion using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chem.*, **2017**, 221, 822-828.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., Jaziri, M.E. The formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanism. *Biomed. Research. Int.*, **2015**, 75938.
- Rauscher, H., Rasmussen, K., Sokull-Kluttgen, B. Regulatory aspects of nanomaterials in the EU. *Chemie Ingenieur. Technik*, **2015**, 89 (3).
- Rayman, M.P. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, **2000**, 356(9225), 233-241.
- Rayman, M.P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br. J. Nutr.*, **2004**, 92(4), 557-73.
- Rayman, M.P. Selenium and human health. *The Lancet*, **2012**, 379(9822), 1256- 1268.
- Rebolj, K., Pahovnik, D., Zagar, E., Characterization of a protein conjugate using an asymmetrical-flow field-flow fractionation and a size-exclusion chromatography with multi-detection system. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(17), 7374-83.

Reschiglian, P., Rambaldi, D.C., Zattoni, A. Flow field-flow fractionation with multiangle light scattering detection for the analysis and characterization of functional nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399(1), 197- 203.

Rhim, J.W., Park, H.M., Ha, C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog. Polym. Sci.*, **2013**, 28, 1629-1652.

Roilo, D., Maestri, C.A., Scarpa, M., Bettotti, P., Checchetto, R. Gas barrier and optical properties of cellulose nanofiber coatings with dispersed TiO₂ nanoparticles. *Surf. Coat. Tech.*, **2017**, 343, 131-7.

Rossi, M., Cubadda, F., Dini, L., Terranova, M.L., Aureli, F., Sorbo, A., Passeri, D. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. *Trends Food Sci. Tech.*, **2014**, 40(2), 127-148.

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanism of action. *Virulence*, **2018**, 9(1), 522-554.

Salarbashi, D., Tafaghodi, M., Bazzaz, B.S.F. Soluble soybean polysaccharide/TiO₂ bionanocomposite film for food application. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 186, 384-93.

Samanta, S., Singh, B.R., Adholeya, A. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using an *Ectomycorrhizal* strain EM-1083 of *Laccaria fraternal* and its nanoanti-quorum sensing potential against *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J. Microbiol.*, **2017**, 57(4), 448-460.

Sarkar, P., Choudhary, R., Panigrahi, S., Syed, I., Sivapratha, S., Dhumal, C.V. Nano-inspired systems in food technology and packaging. *Environ. Chem. Lett.*, **2017**, 15, 607-22.

Schimpf, M., Caldwell, K., Giddings, J.C. (Eds.). Field-flow fractionation. Handbook, John Wiley & Sons, Inc., **2000**.

Seil, J.T., Webster, T.J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *Int. J. Nanomed.*, **2012**, 7, 2767.

Shakibaie, M., Adeli-Sardou, M., Mohammadi-Khorsand, T., Zeydabadi-Nejad, M., Amirafzali, E., Amirpour-Rostami, S., Ameri, A., Forootanfar, H. Antimicrobial and antioxidant activity of the biologically synthesized tellurium nanorods; a preliminary *In vitro* study. *Irani J. Biotech.*, **2017**, 15(4), 268-276.

- Sharahi, J.Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M.K., Hashemi, A. Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *J. Cell Physiol.*, **2019**, 234, 14689-14708.
- Sharma, R., Bisen, D.P., Shukla, U., Sharma, B.G. X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Res. Sci. Technol.*, **2012**, 4(8), 77-79.
- Singh, B.N., Upreti, D.K., Singh, B.R., Defoirdtt, T., Gupta, V.K., De Souza, A.N., Singh, H.B., Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Vahabi, K. Bactericidal, quorum quenching and anti-biofilm nanofactories: a new niche for nanotechnologists. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2016**, 37(4), 1-16.
- Singh, M., Sahareen, T.. Investigation of cellulosic packets impregnated with silver nanoparticles for enhancing shelf-life of vegetables. *Lebenson. Wiss. Technol.*, **2017a**, 86, 116-22.
- Singh, T., Shukla, S. Kumar, P., Wahla, V., Bajpai, V.K., Rather, I.A. Application of nanotechnology in food science: perception and overview. *Front. Microbiol.*, **2017b**, 8, 1501.
- Skalickova, S., Milosavljevic, V., Cihalova, K., Horky, P., Richtera, L., Adam, V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, **2017**, 33, 83-90.
- Sofos, J.N. & Geornaras, I. Overview of current meat and hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* 0157:H7 in non intact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Sci.*, 86, **2010**, 2-14.
- Song, Y., Guan, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., Chen, X. *In vitro* cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutat. Res.*, **2014**, 769, 113-8.
- Spuznar, J., Lobinski, R., Parnge, A. Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Appl. Spectrosc.*, **2003**, 57, 102A-112A.
- Sredni, B. Immunomodulating tellurium compound as anti-cancer agents. *Semin. Cancer Biol.*, **2012**, 22(1), 60-69.
- Sriramulu, D.D., Liang, M., Hernandez-Romero, D., Raux-Deery, E., Lunsdorf, H., Parsons, J.B., Warren, M.J., Prentice, M.B. *Lactobacillus reuteri* DSM 2016 produces propanediol by disproportionation. *J. Bacteriol.*, **2008**, 190, 4559-4567.

Stormer, A., Bott, J., Kemmer, D., Franz, R. Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics. *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, 63, 39-50.

Sussman, E.M., Jayanti, P., Dair, B.J., Casey, B.J. Assessment of total silver and nanoparticle extraction from medical devices. *Food Chem. Toxicol.*, **2015**, 85, 10-19.

Suzuki, K.T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *J. Health*, **2005**, 51(2), 107-114.

Tam, K., Ho, C., Lee, J., Lai, M., Chang, C., Rheem, Y., Chen, H., Hur, N., Myung, V. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2010**, 74, 696–700.

Tan, L.C., Nanchaiah, Y.V., van Hullebusch, E.D., Lens, P.N.L. Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. *Biotechnol. Advan.*, **2016**, 34, 886-907.

Tapiero, H. & Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.*, **2003**, 57, 399-411.

Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*, **2010**, 6(2), 257-62.

Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., Hasselov, M., Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit. Contam. A*, **2008**, 25, 795-821.

Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tiede, D., Tear, S.P., David, H., Lewis, J. A robust size characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in “real” environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2009**, 24, 964-972.

Torrent, L., Laborda, F., Margui, E., Hidalgo, M., Iglesias, M. Combination of cloud point extraction with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry to characterize silver nanoparticles in soil leachates. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, 411 (20), 5317-5329.

Tran, P.A., Webster, T.J. Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices. *Nanotechnology*, **2013**, 24, 155101.

- Tuoriniemi, J., Cornelis, G., Hassellöv, M. size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles. *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 3965–72.
- Turan, N.B., Chormey, D.S., Büyükpınar, C., Engin, G.O., Bakirdere, S. Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination. *Trends Anal. Chem.*, **2017**, 91, 1-11.
- Ulrich, A., Losert, S., Bendixen, N., Al-Kattan, A., Hagendorfer, H., Nowack, B., Adlhart, C., Ebert, J., Lattuada, M., Hungerbühler, K. Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2012**, 27(7), 1120-1130.
- Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.T., Faure, D., Dessaux, Y. A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum- quenching lactonases. *Appl. Environ. Microb.*, **2008**, 74, 1357–66.
- Varikasuvu, S.R., Pasad, V.S., Kothapalli, J., Manne, M. Brain Selenium in Alzheimer's Disease (BRAIN SEAD Study): a systematic review and meta-analysis. *Biol. Trace. Elem. Res.*, **2019**, 189(2), 361-369.
- Vera, P., Echegoyen, Y., Canellas, E., Nerín, C., Palomo, M., Madrid, Y., Camara, C. Nano selenium as antioxidant agent in a multilayer food packaging material. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, 408(24), 6659-6670.
- Verbeke, F., Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele, E., Van de Wiele, C., De Spiegeleer, B. Peptides as quorum sensing molecules: measurement techniques and obtained levels *In vitro* and *In vivo*. *Front. Neurosci.*, **2017**, 11, 183.
- Vicente-Zurdo, D., Gomez-Gomez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. Impact of fish growing conditions and cooking methods on selenium species and salmon fillets. *J. Food Compos. Anal.*, **2019**, 83, 103275.
- Vinceti, M., Wei, E.T., Malagoli, C., Bergomi, M., Vivoli, G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev. Environ. Health*, **2001**, 16(4), 233-51.
- Von Der Kammer, F., Legros, S., Hofmann, T., Larsen, E.H., Loeschner, K. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30, 425–436.
- Wadhwani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., Chopade, B.A. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, 100(6), 2555-66.

- Wagh, M.S., Patil, R.H., Thombre, D.K., Kulkarni, M.V., Gade, W.N., Kale, B.B. Evaluation of anti-quorum sensing activity of silver nanowires. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, 97, 3593-3601.
- Walczak A.P., Fokkink, R., Peters, R., Tromp, P., Herrera, Z.E., Rietjens, I.M., Hendriksen, P.J., Bouwmeester, H. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an *in vitro* human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology*, **2013**, 7(7), 1198-210.
- Walker, J.N. & Horswill, A.R. A coverslip-based technique for evaluating *Staphylococcus aureus* biofilm formation on human plasma. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **2012**, 27(2), 39.
- Wang, H., Zhang, J., Yu, H. 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol. Med.*, **2007**, 42(10), 1524–1533.
- Wang, T., Yang, L., Zhang, B., Liu, J. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids Surf. B: Biointerf.*, **2010**, 80, 94–102.
- Wang, Q. & Webster, T.J. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on polycarbonate medical devices. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2012**, 100(12), 3205-10.
- Waters, C.M. & Bassler, B.L. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **2005**, 21, 319-46.
- Wei, Q. & Ma, L.Z. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14, 20983-21005.
- Whiteley, M., Diggle, S.P., Greenberg, E.P. Bacterial quorum sensing: the progress and promise of an emerging research area. *Nature*, **2017**, 551(7680), 313–320.
- World Health Organization (WHO). Zinc. *WHO Press*, **2001**, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). Infant and young child feeding. Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. WHO Press, **2009**, Geneva, Switzerland.
- Wu, Y., Guo, T., Lin, Y., Yao, Y., Lian, W., Lin, L., Song, J., Yang, H. An inorganic prodrug, tellurium nanowires with enhanced ROS generation and GSH depletion for selective cancer therapy. *Chem. Sci.*, **2019**, 10, 7068.

- Xu, J., Zhang, M., Bhandari, B., Kachele, R. ZnO nanoparticles combined radio frequency heating: A novel method to control microorganism and improve product quality of prepared carrots. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2017**, 44,46-53.
- Xu, J., Zhang, M., Bhandari, B., Cao, P. Microorganism control and product quality improvement of Twice-cooked pork dish using ZnO nanoparticles combined radio frequency pasteurization. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **2018**, 95, 65-71.
- Yadavalli, T. & Shukla, D. Role of metal and metal oxide nanoparticles as diagnostic and therapeutic tools for highly prevalent viral infections. *Nanomedicine*, **2017**, 13(1), 219-230.
- Yang, G., Zheng, J., Tagami, K., Uchida, S. Rapid and sensitive determination of tellurium in soil plant samples by sector-field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, **2013**, 116, 181-7.
- Yang, Y., Luo, L., Li, H.P., Wang, Q., Yang, Z.G., Long, C.L. Separation and determination of silver nanoparticle in environmental water and the UV-induced photochemical transformations study of AgNPs by cloud point extraction combined ICP-MS. *Talanta*, **2016**, 161, 342-349.
- Yazdi, M., Mahdavi, M., Setayesh, N., Esfandiyar, M., Shahverdi, A. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. *DARU J. Pharm. Sci.*, **2013**, 21, 33.
- Ye, D., Dawson, K. A., Lynch, I. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. *The Analyst*, **2014**, 140(1), 83-97.
- Youssef, A.M., El-Sayed, S.M., Salama, H.H., El-Sayed, H.S., Dufresne, A. Evaluation of bionanocomposites as packaging material on properties of soft white cheese during storage period. *Carbohydr. Polym.*, **2015**, 132, 274-85.
- Yusoff R, Nguyen LTH, Chiew P, Wang ZM, Ng KW. Comparative differences in the behaviour of TiO₂ and SiO₂ food additives in food ingredient solutions. *J. Nanopart. Res.*, **2018**, 20, 76.

- Zare, B., Aramarzi, M.A., Sepehrizadeh, Z., Shakibaie, M., Rezaie, S., Shahverdi, A.R. Biosynthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities. *Mater. Res. Bull.*, **2012**, 47, 3719-3725.
- Zare, B., Nami, M., Shahverdi, A.R. Tracing tellurium and its nanostructures in biology. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2017**, 180 (2), 171-181.
- Zazo, H., Colino, C.L., Lanao, J.M. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J. Control. Release*, **2016**, 224, 86-102.
- Zhai, Q. Xiao, Y., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H., Narbad, A., Chen, W. Identification of key proteins and pathways in cadmium tolerance of *Lactobacillus platarum* strains by proteomic analysis. *Nat. Sci. Rep.*, **2017**, 1182, 1-17.
- Zhang, J., Wang, X., Xu, T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with selenomethylselenocysteine in mice. *Toxicol Sci.*, **2008**, 101 (1), 22-31.
- Zhang, W., Chen, Z., Liu, H., Zhang, L., Gao, P., Li, D. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila*. *Colloids Surf. B: Biointerf.*, **2010**, 88, 196-201.
- Zhang, S. Luo, Y., Zeng, H., Wang, Q., Tian, F., Song, J., Cheng, W.H. 2011. Encapsulation of selenium in chitosan nanoparticles improves selenium availability and protects cells from selenium-induced DNA damage response. *J. Nutr. Biochem.*, **2011**, 12, 1137-42.
- Zhang, H., Hortal, M., Jordá-Beneyto, M., Rosa, E., Lara-Lledo, M., Lorente, I. ZnO-PLA nanocomposite coated paper for antimicrobial packaging application. *Lebenson. Wiss. Technol.*, **2017a**, 78, 250-7.
- Zhang, X., Xiao, G., Wang, Y., Zhao, Y., Su, H., Tan, T. Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. *Carbohydr. Polym.*, **2017b**, 169(169), 101-7.
- Zhong, L., Yu, Y., Lian, H.Z., Hu, X., Fu, H., Chen, Y. Solubility of nano-size metal oxides evaluated by using in vitro simulated lung and gastrointestinal fluids: implication for health risks. *J. Nanopart. Res.*, **2017**, 19, 375.
- Zheng, K., Setyawati, M.I., Leong, D.T., Xie, J. Antimicrobial silver nanomaterials. *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, 357, 1-17.

Zong-Hong, L. & Chris-Wang, C.R. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.*, **2005**, 92(2-3), 591–594.

Zhou, X.X., Liu, R., Liu, J.F. Rapid chromatographic separation of dissoluble Ag(I) and silver-containing nanoparticles of 1-100 nanometer in antibacterial products and environmental waters. *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, 48(24), 14516-14524.

Zhou, X.X., Liu, J.F., Geng, F.L. Determination of metal oxide nanoparticles and their ionic counterparts in environmental waters by size exclusion chromatography coupled to ICP-MS. *NanoImpact*, **2016**, 1, 13-20.

Zou, X., Li, P., Lou, J., Fu, X., Zhang, H. Stability of single dispersed silver nanoparticles in natural and synthetic freshwaters: Effects of dissolved oxygen. *Environ. Pollut.*, **2017**, 230, 674-682.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AAS	Espectroscopia de absorción atómica (Atomic Absorption Spectroscopy).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AF ⁴	Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation).
AFM	Microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy).
AFS	Espectroscopia de fluorescencia atómica (Atomic-Fluorescence Spectroscopy).
AgNPs	Nanopartículas de plata.
AHL	N-acil homoserina lactonas.
AI-2	Autoinductor 2.
ANSES	Agencia Francesa de Seguridad, Salud Ambiental y Ocupacional.
ARN	Ácido ribonucleico.
Arg	Arginina.
AuNPs	Nanopartículas de oro.
CE	Electroforesis capilar (Capillary Electrophoresis).
CLSM	Microscopía confocal láser de barrido (Confocal Laser Scanning Microscopy).
CPE	Extracción en punto de nube (Cloud Point Extraction).
CV	Cristal violeta.
DLS	Dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EDXS	Espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X.
ELS	Dispersión de luz electroforética (Electrophoretic Light Scattering.)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority).
ESI	Ionización por electrospray (Electrospray Ionization).
FC	Citometría de flujo (Flow Citometry).
GC	Cromatografía de gases (Gas Chromatography).
HDC	Cromatografía hidrodinámica (Hydrodynamic Chromatography)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).
IEC	Cromatografía de intercambio iónico (Ionic Exchange Chromatography).
IP	Yoduro de propidio
LAB	Bacterias ácido lácticas (Lactic Acid Bacteria).
Lys	Lisina.
MALS	Dispersión multiángulo de luz láser (Multiangle Laser Light Scattering).
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization).
MS	Espectrometría de masas.
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem.
NanoLC	Nanocromatografía líquida.
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis).

OTA	Ocratoxina A.
PLA	Ácido poliláctico.
Q	Cuadrapolo.
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (quantitative Polymerase Chain Reaction).
QQ	<i>Quorum quenching</i> .
QS	<i>Quorum sensing</i> .
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RPC	Cromatografía en fase inversa (Reverse Phase Chromatography).
SC-ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de células individuales (Single-Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños (Size-Exclusion Chromatography).
SEM	Microscopía electrónica de barido (Scanning Electron Microscopy).
SILAC	Marcaje isotópico estable de aminoácidos en cultivo celular (Stable Isotopic Labelling with Amino Acids in Cell Culture).
SP-ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales (Single-Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).
TEM	Microscopía electrónica de Transmisión (Transmission Electron Microscopy).
TiO ₂ NPs	Nanopartículas de óxido de titanio.
TMAH	Hidróxido de tetrametilamonio.
TOF	Tiempo de vuelo (Time-Of-Flight).
UF	Ultrafiltración.
UFC	Unidad Formadora de Colonias.
US	Ultrasonidos.
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visible.
ZnONPs	Nanopartículas de óxido de cinc.

ANEXOS

ANEXO A: CAPÍTULO DE LIBRO

La nanotecnología en el ámbito alimentario. Aplicación de las nanopartículas metálicas.

Nanotechnology in the Food Field. Application of Metal-Based Nanoparticles.

Gómez-Gómez, B., Madrid, Y.

Current and Future Developments in Food Science, 2019, 1, 87-127.

Nanotechnology in the Food Field: Application of Metal-Based Nanoparticles

Beatriz Gómez-Gómez and Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

Abstract: Nanotechnology offers a wide range of applications in the food sector such as development of new tastes and textures, nanoencapsulation of bioactive food components, design of nutrient delivery systems, nanosensors to detect spoilage or contamination, and the design of new food packaging materials. Although metal-based nanoparticles (AgNPs, SiO₂NPs, TiO₂NPs, ZnONPs...) have extensively been applied due to their antimicrobial, antioxidant and UV-blocking properties, there is limited knowledge about the impact of nanoparticles on human health and environment. For safety reasons, the EU has issued regulations requiring labelling of the nanomaterials in the ingredients list. Therefore, new analytical methods should be used to characterize nanomaterials but, since there is no single and universal method that can be applied to fully characterize nanoparticles, the need for multimethod approaches is widely acknowledged. This chapter focuses primarily on the application of metal-based nanoparticles in the food sector and the analytical methodologies used for nanoparticle characterization. Regarding the applications of nanoparticles, special attention should be paid to their antimicrobial properties and their use for developing active food packaging materials. Since the characterization of nanoparticles in complex matrices is troublesome, a detailed description of the prospects and difficulties of the analytical techniques commonly employed is given. Similarly, factors affecting nanoparticles stability such as sample preparation, interaction with food matrices, food stimulants, and chemicals used in “in vitro” gastric digestion procedures are also described. Finally, EU regulatory guidelines on nanomaterials are included and discussed.

Keywords: Analytical methodologies, Current EU directives, Food, Metal-based nanoparticles, Nanoparticles stability, Nanotechnology, Sample treatment.

INTRODUCTION

Nanotechnology has a huge impact on our daily life. It has revolutionized the industrial sector due to large-scale production of nanosized materials and the

* **Corresponding author Yolanda Madrid:** Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain; Tel/Fax: +34 913945149; E-mail: ymadrid@quim.ucm.es

growing investment in this field from governments and industry worldwide. According to the European Commission recommendation, a nanomaterial can be defined as “a natural, incidental, or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions are in the size range 1-100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety, or competitiveness, the number size distribution threshold of 50% may be replaced by a threshold between 1% and 50%” [1]. The impact of nanotechnology is such that the term “nanotechnology” has become synonymous with promising innovative products.

Nanosized materials have gained special attention due to their singular properties compared to bulk materials. First, they have a greater surface area per unit mass in contrast to larger particles that makes them more reactive. Second, the dominance of quantum effects at the nanoscale significantly affects the optical, magnetic, and electrical properties of the material. Among nanostructures, nanoparticles (NPs) are a category with important applications on sectors like medicine and medical devices, engineering and communication technologies, and in some industrial areas such as electronics, photonics, textile, pharmaceutical, food, and cosmetics. A nanoparticle is defined as a nanoform that has one or more dimensions of the order of 100 nm or less [2, 3]. This group comprises a heterogeneous variety of materials that are classified based on their composition into different categories: carbon-based nanoparticles (nanotubes, fullerenes, NPs of latex and graphenes), metal/metalloid-based nanoparticles (Fe, Au, Ag, TiO₂NPs, ZnONPs, SiO₂NPs, CeO₂NPs, quantum dots) and aluminium silicates (zeolites, clays). Nowadays, there are more than 1600 nanotechnology-based consumer products on the market [4]. Among all, metal and metal oxide nanoparticles have gained great research attention due to their relevant antioxidant, antimicrobial and blocking UV properties.

The use of nanomaterials in the food sector has exponentially grown in recent years. Nanotechnology offers a wide range of applications (Fig. 1) in food processing such as the development of new tastes and textures, and the encapsulation of food components and additives to control the release of flavors and deliver nutraceuticals. Nanomaterials in the food industry have been mostly applied to develop food packaging materials for extending the shelf-life of foodstuffs. Nanoparticles are added to the packaging materials to improve their mechanical strength and barrier properties. Moreover, smart and intelligent food packages including nanoparticles as active components and nanosensors have been manufactured for food quality parameters control such as moisture, oxygen and carbon dioxide contents, microbial surface contamination, freshness and food conditions during transport and storage. Although most of the aforesaid

Advances in the Determination of Xenobiotics in Foods Gómez-Gómez and Madrid applications are still in progress, the prospects of nanotechnology in the food technology sector are extraordinary.

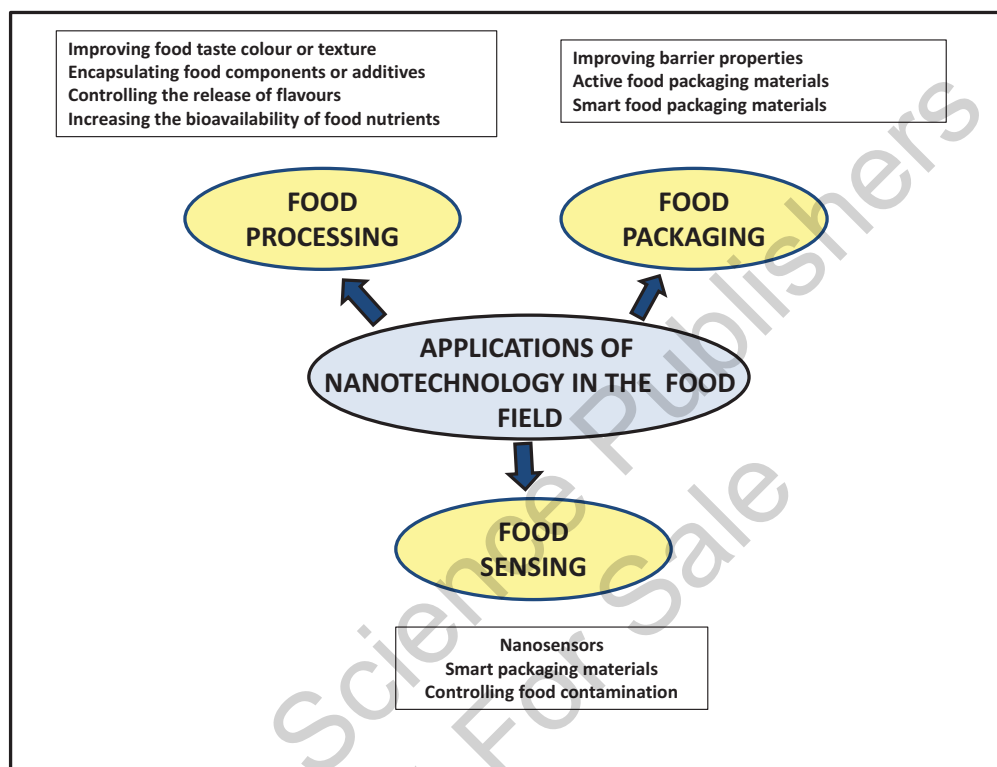


Fig. (1). Main applications of nanotechnology in the food field.

However, the widespread use of nanotechnology in our daily life is a matter of concern due to the increasing exposure of humans and ecosystems to nanoparticles which makes necessary a thorough assessment of their toxicological impact. For safety reasons, the EU has issued regulations requiring labelling of the nanomaterials in the ingredients list [5]. Consequently, there is an urgent need for developing analytical methods to identify nanoparticles in consumer products and to enable scientists to detect, identify and quantify them in complex matrices such as food and environmental samples. Unfortunately, since there is no single and universal method that can be applied to fully characterize nanoparticles, the need for multimethod approaches is widely accepted. The most common techniques for characterizing nanoparticles are Dynamic Light Scattering (DLS), Multi-angle Light Scattering (MALS) and nanoparticles tracking analysis (NTA); classical electron microscopy (TEM/SEM); analytical separation techniques such

as ultrafiltration and asymmetric field flow fractionation coupled to ICP-MS or MALS detectors, and single particle ICPMS (sp-ICPMS). NPs stability is a key step when characterizing NPs. Several factors such as sample treatment, dilution, pH modifications, interaction with mobile phases, and food matrix components should be carefully controlled as they can alter the initial morphology of NPs. Along with developing analytical methods, the production of reference materials (RMs) is also required for method validation. Additionally, methods for testing nanomaterials safety including *in vitro* and *vivo* assays should be applied.

This chapter provides a detailed overview on the application of metal-based nanoparticles in the food sector. The first part is focused on their main applications and regulatory issues. The second outlines the analytical methodologies used for their detection, identification and quantification, and the difficulties encountered in their determination. Particular attention will be paid to those factors affecting nanoparticles stability (sample treatment, interaction with food matrix, and food simulants).

METAL-BASED NANOPARTICLES IN THE FOOD SECTOR

As mentioned earlier, the application of nanotechnology in the food field is growing tremendously. Metal-based nanoparticles are one of the most extensively applied nanostructures, especially as antimicrobial and antioxidant agents to increase the shelf-life of food products. This section will place greater emphasis on the most important applications of this type of nanoparticles.

Nanoparticles in Food Processing

Nanotechnology is used in food processing to improve color, texture and food taste; for encapsulating food components or additives, controlling the release of flavors, increasing the bioavailability of food components, enhancing functionality and nutritional values, and expanding the shelf-life of food products [6]. These applications are restricted in the case of metal and metal oxide nanoparticles due to their greater toxicity compared to other nano-systems such as polymeric nanoparticles, nanoemulsions, liposomes or nanoscale edible coatings that are often based on natural food ingredients [7]. However, several studies including metallic NPs have been reported in the literature. For example, Shah and co-workers produced polysaccharide based edible coatings with silver nanoparticles (AgNPs) in order to extend the shelf-life and preserve the quality of kinnow mandarin during long storage periods. For this purpose, they mixed 1:1 carboxymethyl cellulose (CMC) or guar gum with 20 nm spherical AgNPs to achieve the edible coating CMC-Ag and guar gum-Ag, respectively. Kinnow mandarins were further spread with the edible coatings and subsequently storage during 120 days at 4 °C and 10 °C. The results evidenced that the coated CMC-Ag

and guar gum-Ag prevented losses from the main volatile components responsible for the aroma (limonene, linalool and c-terpinene) and preserved the sensorial characteristics of the fruit [8]. Xu and co-workers employed ZnO nanoparticles combined with radio frequency heating as an effective method for performing pasteurization. The procedure was firstly applied to carrots and they reported that the shelf-life of treated carrots was extended up to 60 days. Losses of hardness, color and carotenoids were also reduced [9]. The same treatment was later applied to a twice-cooked pork dish to control microorganism proliferation. The use of this pasteurization method allowed the authors to get heating uniformity and to reduce the loss of texture and flavor when compared with the conventional high pressure steam sterilization [10].

Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Food Safety

Foodborne diseases are serious threats to global health. Food contamination may occur at any step of the food chain production or even during food consumption due to food spoilage and food contamination with human pathogen microorganisms [11]. It has been documented that many bacterial infections are resistant to at least one of the antimicrobial agents frequently used to fight infection [12]. The incidence of persistent bacterial infections has notably increased over the past few decades. In this line, the production of bacterial biofilms has been considered in several studies as the major factor linked with this issue. A biofilm is an assemblage of microbial cells that grow attached to a surface and embedded in a matrix composed of extracellular polymeric substances (EPS) mainly polysaccharides, proteins, phospholipids, and nucleic acids [13, 14]. The presence of microbial biofilms is becoming one of the major causes of food contamination in industrial food processing sectors such as brewing and seafood, dairy, poultry, and meat. Microbial biofilms are formed on the equipment surfaces of production lines originating hygiene problems, food spoilage, and post-processing contamination. As a consequence, the shelf-life of the food products decreases along with the appearance of infections and economic losses [14]. For instance, microbial biofilms of *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Shigella spp.*, and *Staphylococcus aureus* are commonly found in dairy and egg processing industries. Similarly, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Vibrio spp.* have been frequently isolated from surfaces of industrial equipment used in seafood processing plants [15]. Bacterial cells within the confines of a biofilm have the ability to survive in nutrient deficient conditions, to acquire new genes for virulence and even to protect the bacteria community against currently employed disinfectant and antibiotics [16]. Hence, biofilm associated infections are 100-1000 times less susceptible to antibiotic treatment compared to the planktonic mode of microbial growth [17]. Consequently, there is an urgent demand for alternative antibacterial and antibiofilm agents to fight against antibiotic

resistance and biofilm-associated infections. In this sense, the use of nanoparticles as new tools to overcome such problems is gaining interest within the scientific community. Nanoparticles may not only increase drug efficacy but also reduce antibiotic resistance due to their direct interaction with the bacterial cell [18].

The antimicrobial activity of nanoparticles is highly dependent on their physicochemical properties such as size, charge, zeta potential, surface morphology, and crystal structure. Additionally, factors like the type of bacterial strain, the exposure time, and the environmental conditions like pH or UV-Vis irradiation play a key role when evaluating the antimicrobial activity of nanoparticles [18]. The influence of many different parameters makes difficult to entirely rule out the mechanisms governing the antimicrobial activity of nanoparticles that still remain under discussion [19]. However, several mechanisms have been proposed in the literature (Fig. 2).

The production of reactive oxygen species (ROS) has been postulated as one of the main modes of antimicrobial action of metal-based NPs. ROS comprise a group of molecules and reactive intermediates that mainly include the following compounds: superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), the hydrogen peroxide (H_2O_2), the hydroxyl radical ($OH\cdot$), and singlet oxygen. ROS produce changes in the permeability of the cell membrane resulting in bacterial cell membrane damage [20]. Moreover, ROS interact with DNA, therefore accelerating bacterial cell apoptosis [18].

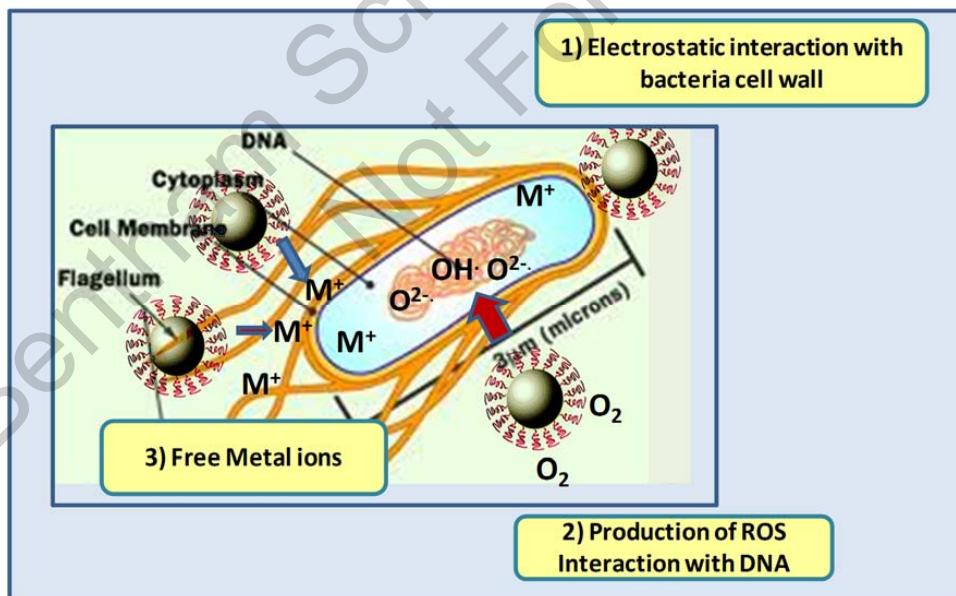


Fig. (2). Antimicrobial mechanisms of nanoparticles.

The release of metal ions from nanoparticles to the surroundings of the bacteria has also been proposed as an antimicrobial mechanism of NPs. The resulting free metal ions are absorbed through the cell membrane and interact with the functional groups of biomolecules disturbing metabolic function. Another mechanism reported is through electrostatic interaction between electronegative groups on bacterial membrane and free metal cations that lead to nanoparticle accumulation on the cell surface, therefore altering the structure and permeability of the cell membrane. Other postulated mechanisms include protein and enzyme dysfunction, genotoxicity, and photokilling [21].

Knowledge of the mechanism of nanoparticles to control pathogenic biofilm growth is still in its infancy stage. The interaction between NPs and biofilm matrix involves three steps. The first comprises the transport of the nanoparticle to the surroundings of the biofilm, followed by the attachment of nanoparticles onto biofilm surface, and the subsequent migration of nanoparticles to the biofilm confines. The EPS where bacterial cells are embedded contribute to the initial deposition and subsequent accumulation. Once the NPs have penetrated into the biofilm, they move within the biofilm mainly by diffusion. NPs diffusion is dependent on the pore size of the biofilm matrix, the charge of the NPs and EPS, the hydrophobicity of the surrounding environment, and the chemical gradient. Once NPs get the bacterial cells, they induce the bacteria dead [22].

Several strategies have been proposed in order to fight the production of bacterial biofilms (Fig. 3). Some of them consider the prevention of the initial bacterial adhesion on the food surface at the first stages of the biofilm development. Others deal with the disturbance of the polymeric matrix. However, one of the most effective tools to eradicate biofilm formation is through the inhibition of a process called quorum sensing (QS), a bacterial cell-to-cell communication system [23]. QS mechanism regulates the biofilm mode of growth through chemical signal molecules called autoinducers. Thus, the disruption of the autoinducers leads to the interruption of the biofilm formation process [24]. Some microorganisms that occur in the food sector like *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa*, have been reported to produce, release and respond to the QS signal molecules [25 - 29].

AgNPs are one of the most extended antimicrobial nanomaterials. They induce the damage of the bacterial membrane through their accumulation on the surface producing changes in the membrane permeability and favoring the penetration of the NPs inside the cell. Therefore, nanoparticle properties like size, shape, and surface charge and nature of the coating agent highly influence the interaction between bacterial membrane and nanoparticles [30]. For example, Demirbas and co-workers synthesized AgNPs using anthocyanins-rich berries obtained from

Rubus fruticosus L. (blackberry), *Fragaria vesca* L. (strawberry) and *Rubus idaeus* L. (raspberry) extracts. The antimicrobial properties of the resulting AgNPs were evaluated against *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* and *B. Cereus*. Although all nanoparticles showed inhibitory effects against the microorganisms selected, those produced from strawberry extracts were the most effective. These results evidenced that differences in the composition of the surface of the capping agent lead to different results in the antimicrobial tests [31]. Similarly, Kujda and co-workers produced AgNPs with different surface properties, and therefore, with different antimicrobial properties [32]. Nanoparticle size has also shown an important effect on antimicrobial activity of AgNPs. Small AgNPs have been reported to be more effective against microorganisms. Dogru and co-workers tested the antimicrobial effectiveness of AgNPs of different diameter size (70, 50 and 30 nm) against *E. coli* and *S. aureus*. Growth inhibition was obtained with all AgNPs tested at a level of NPs exposure of 50 mg L⁻¹; however, the smallest ones (30 nm) showed the best antimicrobial properties. The authors attributed the major inhibitory properties of the smallest AgNPs to their highest surface to volume ratio and their highest capability to release Ag⁺ [33]. Similarly, Raza and co-workers evidenced that nanoparticle shape also influences the antimicrobial activity of AgNPs against *P. aeruginosa* and *E. coli*. Spherical nanoparticles offered the best biocidal behavior compared to other morphologies [34].

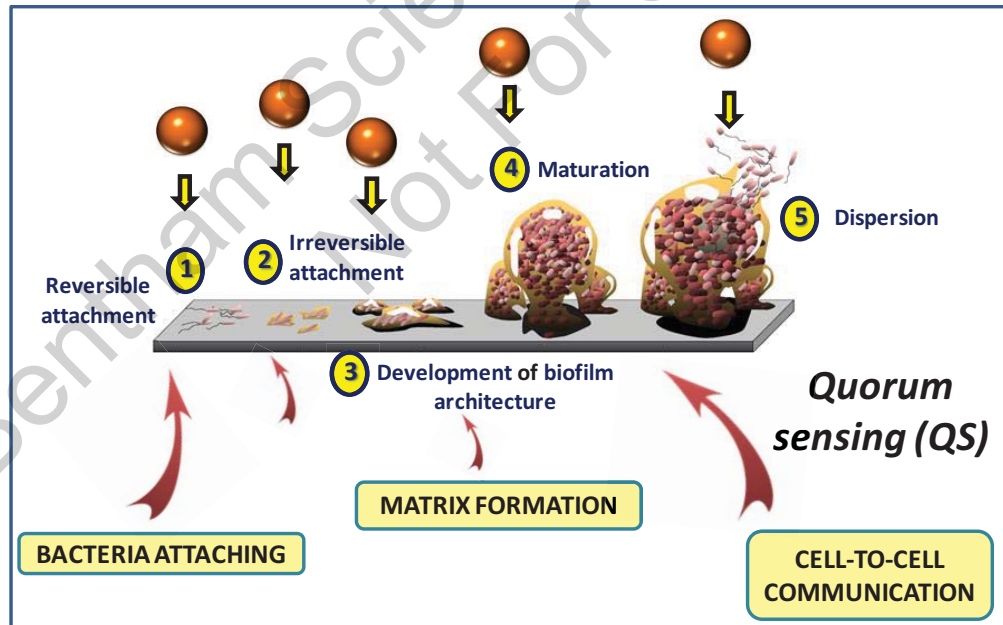


Fig. (3). Mechanisms of nanoparticles against microbial biofilms.

The results described so far are related to bacteria growing in planktonic cultures. However, very few studies have appeared in the literature concerning the impact of AgNPs against bacterial biofilm. Lotha and co-workers have demonstrated that AgNPs synthesized by using purified plant extracts were able to inhibit the biofilm formation of some foodborne pathogens such as *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* [35]. Similarly, Anjugam and co-workers showed the antibiofilm potential against *E. faecalis* and *P. aeruginosa* of AgNPs manufactured from crustacean immune molecule β -1,3 glucan binding protein [36].

The control of *quorum sensing* mechanism is a promising tool to eradicate biofilm formation. Singh and co-workers evidenced that AgNPs were able to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* QS systems [37]. In this line, Waght and co-workers and Naik and co-workers studied the potential of silver nanowire and AgCl-TiO₂NPs to interrupt QS- regulated virulence and biofilm formation. In both cases they were able to inhibit the violacein production in the *Chromobacterium violaceum* strain. This bacterium produces the pigment violacein in response to the autoinducer N-acyl homoserine lactone, the QS signal molecule of Gram negative bacteria. Therefore, a decrease in the violacein production in presence of AgNPs suggests that nanoparticles affect the bacterial QS system [38, 39].

Besides AgNPs, other metallic nanoparticles have been evaluated as antimicrobial agents against food borne pathogens. Copper nanoparticles (CuNPs) could damage the bacterial membrane integrity leading to the death of the microorganisms. Additionally, CuNPs increase the production of ROS affecting the normal cell function in multiple ways such as lipid peroxidation, protein oxidation or DNA degradation [40]. Tovar-Corono and co-workers indicated that CuNPs produced with cyanidine-0-3-glucoside were able to inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermis* [41]. Moreover, CuNPs have also showed antimicrobial activity against *B. subtilis*, *E. coli* and *S. aureus* [42]. A few papers reported the antimicrobial activity of gold nanoparticles. These nanoparticles are able to interact with bacterial membrane, which facilitates their attachment to the internal structure of the membrane, and therefore, activate the mechanism through ROS production [43].

ZnONPs, TiO₂NPs or CuONPs are also considered as antimicrobial agents. Their antibacterial activity mechanism has been largely discussed in the literature but it still remains unclear. ZnONPs are able to interact with bacterial membrane affecting directly the phospholipid bilayer, thus originating cell membrane disruption and nanoparticle internalization. Moreover, the photocatalytic

properties of ZnONPs favor the production of ROS species ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2) on nanoparticle surface under UV irradiation. Furthermore, ZnONPs tend to release Zn^{2+} ions when they are dispersed in aqueous solutions. Consequently, a decrease of cell viability has been observed due to the presence of Zn^{2+} [44 - 46]. TiO_2 NPs also act as a photocatalyst agent in presence of UV-light producing ROS species that induce bacteria death. In addition, TiO_2 NPs cause lipid peroxidation that originates changes on membrane fluidity favoring membrane integrity disruption. Similarly, CuONPs are able to penetrate through bacterial cell causing cell functions disturbance [47].

The antibacterial action of metal oxide nanoparticles against food borne pathogens has attracted the attention of an important number of researchers [21]. For example, Duffy and co-workers recently reported the effectiveness of ZnONPs and CuONPs against a *Salmonella strains* isolated from poultry [48]. Furthermore, Shakerimoghaddam and co-workers found that ZnONPs were able to reduce biofilm formation of *E. coli* isolated from urine samples [49]. Additionally, Long and co-workers studied the effect of UV irradiation time on the photocatalytic disinfection process of TiO_2 NPs against food borne pathogens such as *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* [50]. Furthermore, Jalvo and co-workers proposed TiO_2 NPs as additive for making self-cleaning antimicrobial flat and porous glass surfaces. The resulting functionalized surfaces were irradiated with UV-A during 2 h. Their antibacterial activity was tested against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona putida* afterwards. Although cell viability was clearly affected when bacteria were grown in the self-cleaning surface, the formation of biofilm was not affected [51].

Nanoparticles in Food Packaging

Food packaging materials provide a way of preserving the quality and safety of products during both distribution and storage. Generally, the packaging material should exhibit suitable mechanical, optical, and thermal properties. For instance, packaging materials should act as a barrier against chemical contaminants, permeation of water vapor, oxygen, carbon dioxide or flavors as well as microorganisms [52]. A great variety of materials have been used for this purpose including ceramics, metals or paper. However, synthetic polymers are the most popular ones since they offer attractive advantages such as thermostability, thermal and mechanical properties, lightness, and low prices. Polymers usually employed in food packaging are polyethylene, polypropylene, polystyrene, polyvinyl chloride (PVC), and polyethylene terephthalate (PET), all derived from non-renewable petroleum resources with a potential risk factor for health and environment [53]. Consequently, the development of biopolymers in the field of food packaging is an active research topic. In this sense, a wide range of

biodegradable polymers has been developed. Some of them are derived from plant and animal resources such as polysaccharides, polyesters or proteins while others are synthetic biodegradable polymers like poly(L-lactide) (PLA) or poly(butylene succinate) (PBS); others are produced by microbial fermentation, for example, poly(β -hydroxybutyrate) (PHB). Unfortunately, they offer high gas and vapor permeability and poor resistance which limit their applications [53 - 55]. The addition of nanoparticles to these materials may improve their mechanical strength and barrier properties and provide new characteristics to the material (Fig. 4).

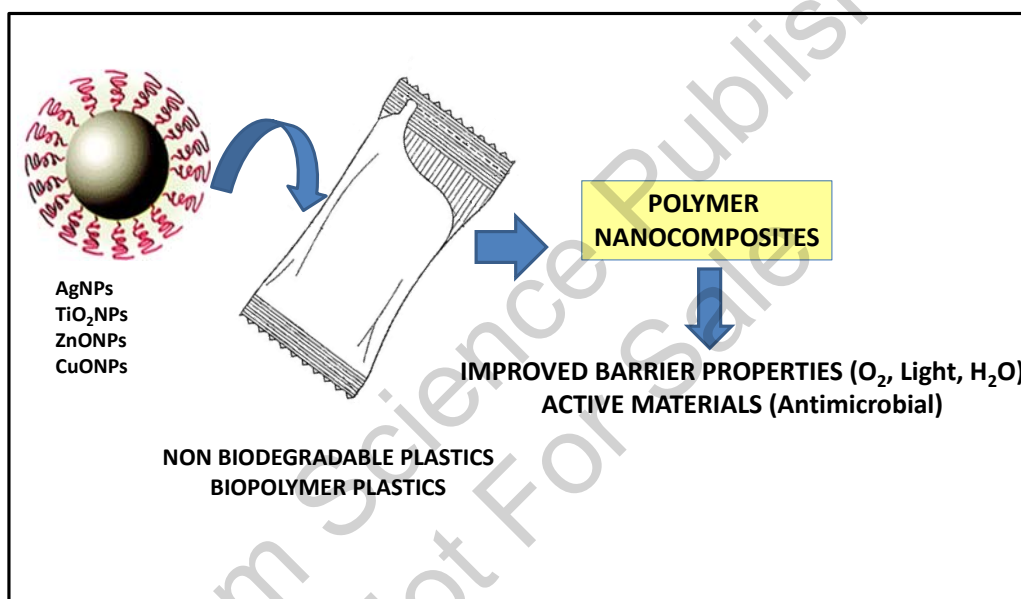


Fig. (4). Application of nanoparticles in developing food packaging materials.

Following the recommendations addressed by the European Union Guidance to the Commission Regulation No 450/2009 [56], a packaging material is designed as active when it performs some desired function other than merely providing a barrier to the external environment. In general, the active material is obtained by adding some compounds into the packaging material that absorb or release substances in order to improve the quality of packaged food or to extend its shelf-life [57 - 59]. In recent years, the use of nanosized compounds has been of great interest in order to develop active food packaging. The resulting nanocomposites can release specific compounds like antioxidant and/or flavors with the aim of improving the sensory characteristics of food as well as preserving the quality of fresh and processed products by scavenging moisture, oxygen and carbon dioxide inside the package. Furthermore, they would offer antibacterial and antioxidant

effects, and even alert consumers of food safety conditions through nanosensor systems which identify specific microbial and/or chemical contaminants or environmental factors [2, 7, 60].

Due to their antimicrobial properties, AgNPs have been widely studied for developing biopolymers packaging coatings. For example, Singh and Sahareen [61] proposed a low cost and eco-friendly cellulosic material impregnated with AgNPs to extend the shelf-life of vegetables (cabbage and tomato). The nutritional value of the vegetables stored in the packaging containing nanoparticles remained unaltered. The developed material also exhibited antimicrobial properties and it was able to keep moisture content that makes vegetables look fresher for longer time. Similarly, a low-density polyethylene nanocomposite with AgNPs has been designed to protect chicken breast fillets during their storage. The study revealed an increase of the product shelf-life due to the presence of nanoparticles [62].

Bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles have been also evaluated to enhance the properties of agar-based films. Agar has been suggested as an alternative source for designing renewable and biodegradable plastic packaging materials. Unfortunately, it offers low thermal stability and very poor oxygen and water diffusion barriers. The Agar/Ag-Cu nanocomposite film significantly improved thermo-mechanical, oxygen barrier and optical properties of the agar. Moreover, the material exhibited an important antibacterial activity against two food-borne pathogenic bacteria, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*. Recently, the Food and Drug Administration (FDA) has approved the use of agar nanocomposite films as material for food packaging [63]. In this line, Li and co-workers employed AgNPs and TiO₂NPs for improving mechanical and thermal stability and antimicrobial properties of PLA film. Moreover, the authors examined the migration of the nanoparticles tested from the film to different food simulants [64].

Among the natural polymers used to develop biodegradable food packaging, chitosan offers attractive features due to its excellent ability to form films, high mechanical strength and antimicrobial properties [65]. Moreover, chitosan has been classified as safe by the Food and Drug Administration (FDA) to be used as a food preservative and has been widely employed for preserving meat and fruits [66, 67]. A chitosan-TiO₂NPs composite coating has been developed by Youssef and co-workers. The presence of TiO₂NPs enhances antibacterial activity against gram positive and gram negative bacteria and fungi. The developed material was successfully applied for storing soft cheese during 30 days [68]. Recently, several examples have appeared in the literature on the use of biodegradable food packaging modified with nanoparticles. Zhang and co-workers employed

TiO₂NPs to improve the mechanical characteristics and expand new functionalities of chitosan-based nanocomposite films [69]. A polysaccharides-based polymer like soluble soybean has been recently investigated in combination with TiO₂NPs for developing transparent, water-soluble and colorless food packaging materials with enhanced mechanical and antimicrobial properties [70, 71]. In addition, a bilayer membrane constituted by PLA, cellulose nanofibers, and TiO₂ nanoparticles was proposed as innovative food container with optical transparency and gas barrier performances. It was found that the presence of TiO₂NPs sharply decreased the transmittance in the UV range and therefore enhanced the optical transparency of PLA [72].

ZnONPs have also been considered as an active agent to be incorporated into a polymeric matrix due to their antimicrobial and UV-light barrier properties without impairing polymer transparency [73]. ZnO bulk is defined by the FDA and the European Food Safety Authority (EFSA) as a “Generally Recognized as Safe (GRAS)” substance, and therefore, their use as an additive for plastic materials is allowed [74]. The number of studies focused on the application of ZnONPs in food packaging has increased in recent years [75 - 77]. Zhang and co-workers, for instance, incorporated ZnO nanoparticles in PLA in order to elaborate a paper-based packaging material to avoid microbiological contamination in foods. Antimicrobial test revealed that the active material was effective in inactivating *E. coli* and *S. aureus* [78]. A blend of ZnO nanorods with the natural mineral kaolin nanoclay was incorporated as nanofillers to provide functionality to semolina-based edible films for food applications. Semolina is a type of wheat flour with high gluten content and with antioxidant activity. However, semolina films offer poor water diffusion barrier and irregular mechanical characteristics. The reinforcement of this material with ZnO nanorods and nano-kaolin endowed the material with low oxygen permeability and water solubility and high UV barrier properties. Additionally, the resulting bio-nanocomposite showed antimicrobial activity against *E. coli* bacteria [79]. Hydrogels have been widely used as water or drip adsorption pads in the food packaging industry [80]. Among them, carrageenan, a water soluble polysaccharide extracted from various species of red marine algae, has been preferred due to its strong gel forming ability along with high water holding capacity [80]. Oun and Rhim prepared carrageenan-based hydrogels film using KCl as a cross-linker and ZnO and CuO nanoparticles as functional fillers. The integration of nanoparticles furnished the material with water holding capacity and thermal stability along with strong antimicrobial activity against *E. coli* and *L. monocytogenes* [81].

Nanoparticles for Food Sensing

Food contamination may appear at any step of the food production chain. Therefore, the development of analytical methodologies enabling a fast and reliable identification and quantification of food components and contaminants is of great importance in order to ensure food quality and safety. In this respect, nanotechnology combined with suitable analytical methodologies and detection techniques is very useful for assessing food quality and safety [82]. For instance, metal and metal oxide nanoparticles are used to develop nanosensors incorporated into the food packaging in the so called “smart packaging” with the aim of monitoring in real time storage conditions. Nanosensors monitor freshness, display information on the quality of the product, and improve safety. Moreover, nanosensors can be inserted in measurement devices for determining parameters affecting food quality and safety [83]. All of these advantages justify the growing interest in developing nanosensors. Du and co-workers, for example, marketed a colorimetric biosensor using single-stranded DNA conjugated with flower-shaped AuNPs for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* [84]. AuNPs have extensively been studied in the field of nanotechnology due to their attractive properties such as high chemical and physical stability, biocompatibility and great affinity with biological molecules that makes their functionalization easy. Moreover, they exhibit exceptional optical properties related to surface plasmons [85]. Consequently, AuNPs can produce different colorimetric signals depending on their size, shape, and surface morphology. In this line, color change has been induced in AuNPs by varying their aggregation states, which enables the performance of colorimetric sensing assays. Based on that, a colorimetric sensing assay has been used to detect selectively *Listeria monocytogenes* [84]. Similarly, Lim and co-workers developed a time-temperature indicator using gelatin-templated gold nanoparticles in order to monitor changes in temperature during storage and distribution of food products. An increment in temperature induces alterations in the stability of gelatin matrix, and therefore, changes in shape, size, and color of AuNPs [86].

Metal oxide nanoparticles have been also used to produce sensor systems. In this context, Ansari and co-workers produced an electrochemical immunosensor assisted by ZnONPs for the immobilization of immunoglobulin antibodies and bovine serum albumin (BSA) for ochratoxin-A (OTA) detection [87]. The mycotoxin OTA can be found in a wide variety of food such as cereals, coffee, wines or dried fruits being hazardous to health through food contamination. The results obtained in this work evidenced that ZnONPs amplified the electrochemical signal and constituted a good platform for attaching biomolecules [87, 88]. Similarly, Shao and co-workers developed an aptasensor based on nano-gapped structures and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the detection of OTA. The

constructed nanosensor was able to successfully detect OTA in water and food samples and it was described as an easy operated, low-priced, ultrasensitive and highly selective sensor system by the authors [89]. Finally, Nesakumar and co-workers immobilized lactate dehydrogenase on ZnO nanorods in order to fabricate an electrochemical biosensor for the detection of lactate. Lactate is used for extending the shelf-life of food products. However, it has been reported that lactate induces adverse effects in children under the age of three years [90].

Nano-food Regulatory Issues in the European Union

As mentioned previously, nanotechnology offers tremendous benefits in many food industry related areas including food processing, food packaging or food safety and quality control. Some of these applications are already on the market but most of them are still being developed. However, the arrival of these new products and ingredients into the market has led to the urgent need of addressing regulatory frameworks. The risks of nanomaterials to human health and environment still remain unclear. In recent years, the European Union has addressed specific legislation for food in which nanomaterials are explicitly or implicitly included [91]. However, sometimes it is difficult to draw the line between what is allowed and not allowed in the legislative frame. For example, regulations have not been developed for all food applications. Additionally, the lack of indications on how to apply the regulatory framework makes difficult its implementation. It is worth noting that most efforts have been directed towards elaborating soft law measurements such as communications, resolutions, recommendations, opinions and guidelines rather than implementing legally-binding regulations, directives, and decisions [92].

Food additives are legislated according to the EC No 1333/2008. This directive highlights that when a food additive is used with characteristics different from the initial approved it shall be considered as a different additive and therefore a re-evaluation is needed in terms of potential adverse effects [93]. TiO₂ (E171) and SiO₂ (E551) are listed as food additives approved for their use in food in EC No 1129/20011, which amended Annex II of EC No 1333/2008. SiO₂ is used in the food industry as anti-caking agent to maintain flow properties of powdered mixes, seasonings and coffee whiteners but also to preserve color or durability as well as to improve handling [94]. TiO₂ is employed as whitening or brightening agent, and therefore, it is mainly found in cheese and sauces, skimmed milk, ice-creams and pastries. In addition, it can be added to the coating of sweets and chewing-gum [95]. Unfortunately, legislation does not specify if these compounds can be used as additives when they are present as nanoforms. The re-evaluation of TiO₂ (E171) performed by EFSA concluded that E171 is not a nanomaterial [96]. However, some publications in the literature described the existence of

nanoparticles in the food additive E171. For example, Peters and co-workers found particles in the nanometer size when monitoring 7 food products containing the additive E171. However, only around 15% of the particles had a size below 100 nm [97]. According to the definition given by the European Commission, a material is considered a nanomaterial only when 50% of the particles are smaller than 100 nm [1]. Similarly, EFSA re-evaluated the use of SiO₂ (E551) as food additive. The document specifies that E551 is a material composed of aggregated nanosized particles with a diameter size greater than 100 nm but it cannot be totally excluded that some of the aggregates are not smaller than 100 nm [98]. In both scientific opinions, EFSA committee has warned that EU specifications for silicon dioxide (E551) and titanium dioxide (E171) are insufficient to properly characterize the use of these materials as food additives. EFSA also advises of the need to select appropriate statistical data when particle size distribution is measured. Moreover, the need for determining the percentage of nanoparticles (in number and in mass) present in these additives is emphasized [96, 98].

EC No 2015/2283 Regulation on novel food established the conditions that a new product has to fulfill to be placed on the EU market. Novel food is defined as “any food that was not used for human consumption to a significant degree within the Union before 15 May 1997, irrespective of the dates of accession of Member States to the Union” [99]. In this context, foods containing or consisting of engineered nanomaterials is listed as one of these food categories and considered as novel food. Textually, engineered nanomaterial is described as “any intentionally produced material that has one or more dimensions of the order of 100 nm or less or that is composed of discrete functional parts, either internally or at the surface, many of which have one or more dimensions of the order of 100 nm or less, including structures, agglomerates or aggregates, which may have a size above the order of 100 nm” [99]. Nevertheless, in this definition, the percentage of particles with a size below 100 nm that is allowed to be considered a nanomaterial is not mentioned. Therefore, differences between what is considered a nanomaterial and what is not in the area of food law may lead to misunderstandings in its application. To the best of our knowledge, none nanomaterial has been included in the list of authorized novel foods although they are regulated and mentioned in EC No 2015/2283 on novel food [100]. Regarding labeling, EC No 1169/2011 Regulation [5] indicates that any nanomaterial present in a food product shall be included in the list of ingredients with the word “nano” after the name of such ingredient. Finally, Regulation No 2015/2283 stipulates that risk assessment of novel food should be carried out by EFSA. Currently, only calcium carbonate (E170) and vegetal carbon (E153) are allowed in foods as nanoforms. Other potential nanoingredients based on titanium dioxide (E171), iron (hydr)oxides (E172), silver (E174), gold (E175), silicon dioxide (E551),

calcium silicate (E552), magnesium silicate (E553a) and talc (E553b), are under study.

Concerning the presence of nanomaterials in food packaging, two legislative documents refer to nanomaterials added or used on food contact materials: “Regulation (EC) 450/2009 on active and intelligent materials and articles to come into contact with food” and “Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food”. Regulation (EC) 450/2009 indicates that “intelligent packaging systems provide the user with information on the conditions of the food and should not release their constituents into the food. Intelligent systems should be positioned on the outer surface of the package and separated from the food by a functional barrier with the aim of preventing the migration of substances from behind that barrier into the food”. Generally, the use of non-authorized substances behind this functional barrier is permitted; however, their migration should remain below 0.01 mg kg^{-1} level. Interestingly, the regulation explicitly indicates that nanomaterials are not considered to be positioned after any functional barrier and this is the only mention to materials with a size range below 100 nm [101]. Additionally, Regulation (EU) No 10/2011 addressed that the use of nanosized substances on plastic materials and articles intended to come into contact with food is only possible when they are in the list of allowed substances to be used as additive or polymer production. Nowadays, Titanium nitride nanoparticles are the only nanomaterial allowed in PET up to 20 mg kg^{-1} . Silicon dioxide also appears in this list but without including any specification on size ranges [102].

As evidenced, nanotechnology is growing and developing without the existence of clear rules and regulations. With the increasing use of these nanomaterials, there is a wide debate on the environmental impact and unknown risks of these materials. Consequently, it is of great importance to assess the potential risks of nanomaterials before their use in the food industry [103]. EFSA has recently launched a guide that provides an overview on how to perform risk assessment of nanomaterials intended to be used in the food and feed area [104]. The main key points of the guide are compiled in Fig. (5). This document highlights the importance to carry out a complete characterization of the physicochemical characteristics of a nanomaterial in order to elucidate its safety. According to the EFSA recommendation, the parameters that need to be properly measured are: material composition and purity, particle size, agglomeration or aggregation state, particle shape, structure, surface chemical composition (composition of the functional groups or coating on the particle surface), surface area, surface charge, appearance, melting point, boiling point, density, porosity, dustiness, pH, formulation (nanopowder, dispersed in solution and the nature of stabilizers).

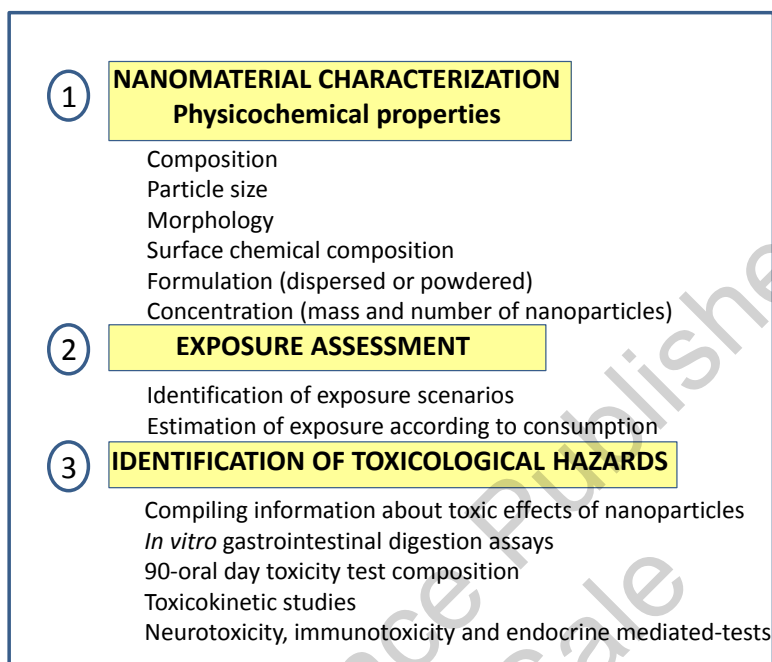


Fig. (5). Main points addressed by EFSA [104] for stabilizing NPs risk assessment.

Concentration of the nanomaterial in terms of both mass (g kg^{-1}) and particle number (n kg^{-1}), and the mass of the material present as ionic form, are requested. Information on physical and chemical stability of the nanomaterial and coating, as well as the solubility, the dispersibility and chemical reactivity, is also required by the EFSA recommendation. Moreover, Appendix C of this guidance includes a list of suitable analytical techniques to be used to determine the parameters described above [104]. The document also recommends the use of standardized method and certified RMs to control method performance in terms of sensitivity, detection limits, and precision. If no RMs are available, EFSA recommends the use of self-generated test materials properly characterized. Additionally, it is pointed out that particle size parameters must always be measured by at least two independent methods (one being electron microscopy) and also the acquisition of other parameters should be performed with more than one method paying special care to the sampling, sample preparation, and dispersion of particles.

Nanoparticles risk assessment implies not only the characterization of their physicochemical properties but also the determination of levels of exposure and hazard identification. EFSA guidelines point out the need of providing data on exposure estimation and scenarios with the aim of properly evaluating the effect

of nanosized materials on human health and environment. According to the guidance, information on the presence of the nanomaterial or its degradation product(s) in the food matrix should also be provided. When exposure data are not available, the worst-case model shall be adopted assuming that the material added in the food matrix and ingested and absorbed is present as nanoform. Finally, the identification of toxicological hazards should be carried out by performing the following steps: First step shall include information on the carcinogenic, mutagenic, and neurotoxic properties of the nanomaterial along with the performance of degradation test under simulated lysosomal conditions and *in vitro* toxicity tests including genotoxicity. The second stage shall include the performance of 90-day oral toxicity test for assessing oral absorption and tissue distribution at different times. Finally, the third step will be dedicated to toxicokinetic studies to explore the extent of accumulation of the nanomaterial during long-term exposure along with the performance of neurotoxicity, immunotoxicity or endocrine-mediated tests [104].

CHARACTERIZATION OF METAL-BASED NANOPARTICLES: THE NEED FOR USING A MULTI-TECHNIQUE APPROACH

The use of nanomaterials in the food field implies the development of analytical methodologies for their detection and quantification. To ensure consumer safety, all ingredients present as nanoforms shall be clearly compiled in the label of the product. Consequently, it is of prime importance to develop analytical methods that can help determine whether products contain nanomaterials or not as a means of supporting nanoparticles regulations.

Unfortunately, there is no single standardized and validated methodology fulfilling the requirements needed for performing a proper characterization of metal-based nanoparticles in terms of size, morphology, identity, and concentration either in mass or particle number. Consequently, nanoparticles characterization implies application of multi-technique platforms. Nowadays, there are a plethora of techniques available (Fig. 6) for characterizing nanoparticles such as those based on light scattering measurements like Dynamic Light Scattering (DLS), Multiangle Light Scattering (MALS) and nanoparticles tracking analysis (NTA); classical electron microscopy (TEM/SEM), and separation techniques such as ultrafiltration, hydrodynamic chromatography (HDC), and asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴). In the last few years, ICPMS in the single particle mode (sp-ICPMS) has emerged as a powerful technique for simultaneously detecting and quantifying metallic nanoparticles without the need of applying previous separation steps. Additionally, ICPMS is commonly used as detector in the separation techniques mentioned above. These techniques have both advantages and drawbacks that must be taken into account

when applied to nanoparticles characterization. For instance, light scattering measurements in DLS mode is widely applied for estimating average size nanoparticles in dispersions; however, the results are not accurate when applying to polydisperse suspensions.

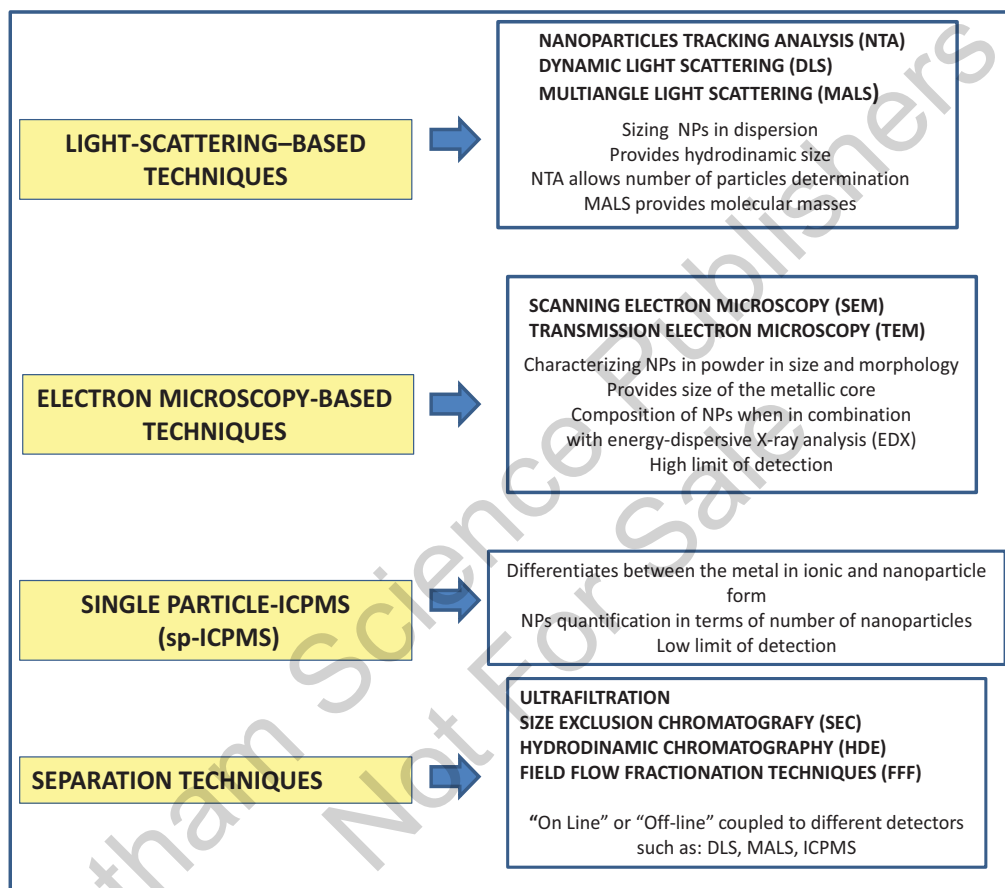


Fig. (6). Techniques most commonly employed for metallic NPs characterization.

DLS provides information on hydrodynamic size and zeta-potential values. The hydrodynamic radius characterizes the overall size of the particle, including particle core, stabilizing agents, and other molecules, *e.g.*, proteins attached to the particle's surface. Zeta potential estimates the stability of the NPs and the degree of aggregation. MALS is used for determining molecular masses and size of macromolecules. NTA allows counting nanoparticles directly in solution in agreement with EC recommendation (2011/696EU). This recommendation indicates that nanoparticles quantification should be done in terms of particle

number concentration rather than in mass concentration [105]. Light scattering techniques are used for sizing NPs in dispersion while electron microscopy-based techniques (SEM/TEM) and atomic force microscopy (AFM) are able to characterize NPs in size and morphology. SEM/TEM techniques are usually the first choice for characterizing NPs since a picture conveys information more effectively than words; however, a significant number of nanoparticles needs to be measured to obtain representative results and additionally, solvent removal is required that may alter the original morphology of the nanoparticles [106]. The above-mentioned techniques can be divided into two groups: those based on light scattering measurements providing information on the hydrodynamic size, and SEM/TEM measurements that provide the size of the metallic core. Therefore, the methodology employed for sizing NPs should always be specified.

The properties of NPs are dependent also on their chemical composition. SEM/TEM in combination with energy-dispersive X-ray analysis (EDX) enables the determination of nanoparticles composition; however, its detection limit is not high enough for detecting nanoparticles at low concentration levels. ICPMS is the method of choice for detecting metal-based NPs as low concentration levels since the limits of detection achieved by the technique reach the ng L^{-1} levels. ICPMS is a very suitable technique for facing the issues derived from NPs characterization due to its broad dynamic range and its capability of performing multielemental and isotopic analysis. Moreover, ICPMS can characterize NPs by using the single particle-ICPMS (sp-ICPMS) mode. ICPMS has been also used as detector in the separation techniques employed in characterizing nanoparticles. In the last few years, the interest of using sp-ICPMS for characterizing NPs has grown considerably. sp-ICPMS is a technique that allows: 1) discrimination between the metal in ionic and nanoparticle form without the need to apply separation techniques, 2) determination of the size distribution of the NPs, and 3) NPs quantification in terms of number of nanoparticles at low limits of detection. The use of sp-ICPMS implies the continuous nebulization of diluted NPs suspensions. During sp-ICPMS analysis, ionic metallic form is detected as a constant signal while metallic nanoparticle form appeared as a transient signal or pulse with a typical duration of 200-500 μs , therefore, ICPMS signals need to be recorded at high time resolution. The intensity of the pulse is proportional to the mass of the detected NPs while the number of pulses is related to particle number concentration [107]. Although the principles behind sp-ICPMS are very straightforward, accurate determination of NP sizes and nanoparticle concentration is not an easy task. Calibrating NPs mass requires the determination of the absolute detection efficiency (counts/atom or counts/mass). For this purpose, a calibration curve of the intensity against NPs of different sizes needs to be constructed; however, the availability of well-defined dispersed NPs solution is very limited. The size detection limit is also dependent on the resolution of the

mass analyzer to distinguish between particulate signals and background noise. In this respect, the technique provides lower detection limits for nanoparticles of less abundant elements, such as silver. The use of sp-ICPMS with quadrupole or sector field-mass analyzer only allows measuring one isotope per particle. In recent years, the use of ICP-MS with time-of-flight, ToF, a simultaneous mass analyzer, has appeared as a promising tool for simultaneously detecting mixtures of nanoparticles of different composition, NPs with multi-elemental composition and untargeted nanoparticles [108]. Therefore, the use of multi-element detection (time-of-flight) sp-ICP-ToFMS is a powerful analytical tool for detecting untargeted NPs and overcoming problems related with background signals due to colloids and dissolved elements [109]. Unfortunately, ICP-ToFMS provides limits of detection 10-100 times higher than ICPMS with a quadrupole as mass analyzer and it is not economically affordable for most laboratories [110].

Legislation also requires the quantification of nanoparticles in the sample. The amount of NPs fraction can be expressed as mass-based concentration or particle-based concentration. Both terms are not directly comparable and the one cannot be converted to the other. Only for those NPs with spherical morphology and known density it is possible to transform NPs concentration in mass units into particle mass-units and *vice versa*. In 2011, the EU commission (2011/696/EU) [1] recommended that NPs quantification should be expressed as particle number concentration rather than as mass concentration. In fact, a small mass of NP fraction can contain a big amount of NPs of small size which are the most harmful. Among the above-mentioned techniques, only NTA and sp-ICPMS can count directly nanoparticles in solution.

Separation techniques have been extensively applied for characterizing NPs according to their size. Ultrafiltration (cut off with a range of 1-100 nm) has been applied for purifying and fractionating NPs. The method provides a first screening of NPs size distribution and it allows easily differentiating between ionic and particulate forms. Chromatographic techniques such as size exclusion chromatography (SEC) and hydrodynamic chromatography (HDC) have been also used for the fractionation of nanoparticles. The former is based on the separation of nanoparticles or a mixture of macromolecules on a stationary phase with a distribution of pore size in the range of the nanoparticles of interest, while in HDC the separation is achieved in narrow capillary tubes. The separation of NPs by chromatographic techniques is challenging. One of the problems when employing SEC is NPs adsorption onto the column packaging material, leading to poor recovery of NPs along with modifications in their hydrodynamic diameter. Several approaches have been applied to avoid such problems, like using columns with large pore size or mobile phases containing additives (surfactants and molecules commonly used as capping agents for stabilizing NPs as for instance

citrate for AuNPs) [111]. Hydrodynamic chromatography is similar to SEC, except that solid-phase interactions are decreased due to the non-porous nature of the stationary phase [112]. Both techniques have been coupled to different detectors such as Light dispersion detectors, MALS, ICPMS, and even single particle-ICPMS.

Field-flow fractionation (FFF) techniques have strongly re-emerged for fractionating and sizing a great variety of compounds of different sizes, from a few nanometers to a few micrometers (nanoparticles, macromolecules, supramolecular assemblies, colloids, and particles). The technique has been applied in many areas such as biomedical, environmental, food, and consumer products. FFF was invented by Giddings in 1966 [113]. The idea behind this separation approach is the use of an external field applied perpendicularly to the direction of sample flowing through an empty and thin channel. Depending on the type of field applied, several FFF techniques are described: flow (FlFFF), thermal (ThFFF), electrical (ElFFF), sedimentation (SdFFF), gravitational (GrFFF), dielectrophoretic (DEP-FFF), acoustic (AcFFF), and magnetic (MgFFF) field-flow fractionation, respectively. However, only flow FFF has application in the laboratories. In flow FFF, a cross flow is perpendicularly applied to the direction of the main flow. The cross flow drives analytes to the accumulation wall, which is covered by an ultrafiltration membrane through which the carrier solution passes while retaining the analytes. Flow FFF separates analytes on the basis of their diffusion coefficient and, therefore according to their hydrodynamic diameter. The main advantages of using flow FFF for NPs fractionation is the absence of stationary phases, the use of mobile phases composed of different pHs and ionic strengths (water is commonly employed as mobile phase) and the capability of on-line coupling with different detectors such as UV-Vis, MALS, and ICPMS [114]. However, the performance of this fractionation technique is affected by a great variety of experimental parameters (nature of the membrane, channel dimensions, mobile phase composition, cross-flow, time, and volume of injection and temperature). The optimization of these parameters is not an easy task which means that the technique is sometimes difficult to apply [115, 116].

As previously mentioned, there is not a single technique that fulfills EFSA requirements and EU guidelines to characterize NPs in food and food technology sectors as far as sizing, composition, morphology, bioaccessibility and toxicology are concerned. Difficulties are greater when NPs need to be characterized in complex matrices such as food where NPs' stability is an important issue. Moreover, the lack of RMs to perform method validation, supporting legislation, and consumer confidence is also an additional problem. Attempts have been made to produce RMs. For instance, two RMs (SiO₂NPs-containing tomato soup and AgNPs-containing breast chicken) were prepared within the frame of NanoLyse

project sponsored by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) (www.nanolyse.eu). Production of RMs of NPs-containing food is not an easy task because NPs transformation due to food matrix, sample treatment and storage. Additionally, lack of homogeneity of the resulting material is also an added problem. Owing to the absence of RMs, Linsinger and co-workers suggested that method validation should include the following steps [117]:

1. Detection of the presence of the nanoparticle (size identity). If this is the case, the type of size must be clarified (hydrodynamic size or core size) as well as the particle size distribution.
2. Identification of the type of nanoparticle (chemical identity and morphology).
3. Quantification of the fraction of nanoparticle present in the sample (mass or number fraction).

Factors Affecting Stability of Nanoparticles

Stability of NPs is a key factor for correctly assessing the impact and potential toxicity of NPs. Dissolution and aggregation/agglomeration of NPs can take place during synthesis, storage, dilution, variations in pH, effect of mobile phases during separation, sample treatment and so on (Fig. 7).

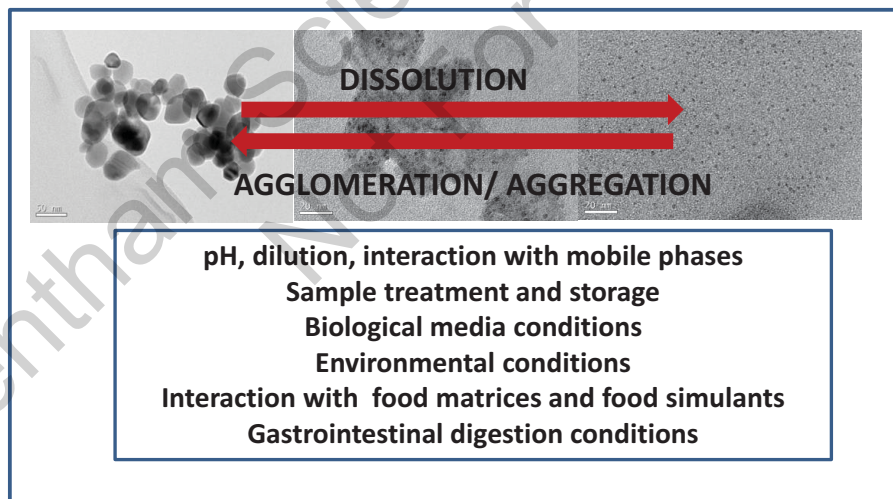


Fig. (7). Factors affecting nanoparticles stability.

Several procedures are used for keeping NPs stability in solution. The use of stabilizers (surfactants, polymers, organic acids, proteins...) is the method of choice for ensuring short and long term stability or even during NPs synthesis.

Selection of the stabilizer or capping agent is crucial since it is accepted that NPs' fate and toxicity are largely influenced by the physical interaction between the surfaces of NPs and cells used in cytotoxicity studies. Several authors further indicated that the nature of the stabilizer is the most important factor in evaluating NPs toxicity [118]. Moreover, the use of a stabilizer may hinder the normal utilization of synthesized nanoparticles in clinical applications because of its toxicity. Palomo-Siguero and co-workers evaluated the toxicity of three types of SeNPs against *Lactobacillus Bulgaricus* [119]. Spherical SeNPs were synthesized using three types of coating materials (chitosan (CS-SeNPs), hydroxyethyl cellulose (HEC-SeNPs), and a non-ionic surfactant (ethoxylated-SeNPs) [120]. The presence of HEC-SeNPs or CS-SeNPs barely affects the viability of the exposed bacteria even at a level of exposure of $10 \mu\text{g Se mL}^{-1}$ while the presence of $10 \mu\text{g Se mL}^{-1}$ in form of ethoxylated-SeNPs produced a dramatic decrease of bacterial cell viability, suggesting the surfactant as the primary cause of the drastic decrease observed in bacterial viability. These results evidenced the importance of the capping agent when establishing the true toxicity of NPs [119]. Unfortunately, this crucial information is missing in most reported toxicity studies.

Similarly, in biological media, NPs can interact with proteins resulting in the formation of a biological corona on the NPs surface. As a result, the NPs surface induces conformational changes in the adsorbed proteins, which may affect the impact of NPs fate and behavior *in vivo* [120]. The formation of a corona is a dynamic process and it is influenced by the physicochemical properties of the NPs (size, morphology, surface chemistry, coating, and so on) [121]. For instance, AuNPs of different sizes (*i.e.*, 5, 10, 20, 30, 60, 80, and 100 nm) were incubated sequentially with blood proteins, such as albumin, fibrinogen, γ -globulin, histone, and insulin. Results from fluorescence measurements evidenced that NPs with a diameter less than 10 nm presented a greater interaction with blood proteins [122]. The shape of the NP is also important as confirmed for TiO_2 nanorods and nanotubes that were differentially adsorbed by plasma proteins [123]. NPs surface charge can also influence protein adsorption. Studies have demonstrated that NPs surfaces with neutral charge bind less proteins than their negatively charged (COOH functionalized) or positively charged (NH_2 functionalized) counterparts [124]. For example, polyethyleneimine-functionalization of ZnONPs improves their interaction with albumin as compared to non-functionalized NPs.

Once released in the environment, NPs can suffer dissolution, oxidation, adsorption and aggregation, depending on the physicochemical characteristics of the receiving media and nanoparticles. Therefore, once emitted, NPs can exist as free ions, adsorbed on particulate matter or forming complexes with ligands. For instance, AgNPs suffer several processes once released in the aquatic environment

such as photooxidative dissolution, photoreduction, sulfidation and chloridation [125]. All these transformations need to be considered to provide a correct assessment of the impact of NPs on human health and environmental risk.

Food is also a complex matrix where metallic/metalloid nanoparticles can be intentionally or unintentionally added. For instance, NPs can migrate from packaging to food and once migrated the stability of the NPs can be affected by the food matrix. In this line, Grombe and co-workers [126] highlighted a decrease in the size of SiO₂NPs when added to tomato soup for preparing a certified reference material. SEM measurements evidenced that tomato soup matrix produced an increase in agglomeration of SiO₂NPs, but still individual NPs were detected. However, SiO₂NPs present a smaller size (30-50 nm) than pure solutions of SiO₂NPs (above 60 nm). Similar results were described for AgNPs spiked chicken meat [127, 128]. A decrease in particle size was observed along with a 60% decrease of particle mass concentration. These observations were explained by a combination of AgNPs dissolution, the appearance of chemical transformations such as the reaction between silver and sulphur (such as Ag₂S) and the occurrence of processes of agglomeration/aggregation. Size decrease and even NPs dissolution was also detected when ZnONPs were in contact with fruit juice and chicken meat. Results provided by ultrafiltration followed by AAS measurements evidenced that the percentage of dissolved Zn in ZnONPs enriched fruit juice was around 60%. Additionally, chicken breast matrix provided an important decrease in ZnONPs size. All these results corroborated the importance of food matrix on NPs stability, and therefore, in their potential toxicity [129].

Once ingested, nanoparticles can also modify their size and morphology as they pass through different conditions before being absorbed by intestinal cells. From a nutritional point of view, the term bioaccessibility has been defined as the fraction of a compound that is released from the food matrix in the gastrointestinal tract, and becomes available for intestinal absorption to enter the blood stream. Otherwise, bioavailability is referred to the fraction of the nutrient ingested that is available for use in physiologic function. Usually, bioaccessibility is assessed by reproducing *in vitro* the physiological conditions occurring during human digestion and by considering the three areas of the digestive system: mouth, stomach and intestines. The main parameters monitored during gastrointestinal *in vitro* assays are temperature, pH, agitation, and enzymatic and chemical composition of the saliva, gastric juice, and intestinal juice. For instance, the physiological conditions occurring during digestion (presence of enzymes and drastic changes of pH) could alter NPs stability, and therefore, affect their absorption in the intestine walls. Böhmer and co-workers [130] reported the effect of the experimental conditions involved in *in vitro* gastrointestinal assay on AgNPs stability. DLS measurements evidenced that artificial saliva has no effect

on the size and aggregation state of the nanoparticles. In contrast, the low pH conditions of the stomach and intestinal fluids produced an increase in the hydrodynamic particle radius as determined by DLS measurements. This increment was attributed to the appearance of conformational changes of the capping agent and/or the adsorption of proteins. Other authors [131, 132] described a release of free silver ions and the formation of chlorine interparticle bridges, and the precipitation of AgCl when AgNPs were exposed to a synthetic stomach fluid because of its low pH (nearly 2) and high electrolyte concentration. However, the absence of food components during the application of *in vitro* gastrointestinal assays could lead to wrong conclusions. Therefore, it is of paramount importance to perform these type of studies in presence of food matrices. Peters and co-workers [133] evaluated the stability of 32 nm SiO₂NPs when added to hot water, coffee with powdered cream milk, soup, and pancake samples. Subsequently, the SiO₂NPs-enriched matrices were submitted to *in vitro* gastrointestinal digestion. SEM and DLS data showed the presence of nanosized SiO₂ during salivary stage in a relative amount (5 to 40% depending on the food matrix) whereas during the subsequent gastric step, SiO₂NPs almost disappeared in soup and coffee. Authors attributed this effect to the low pH (lower than 2) of the gastric step. After intestinal digestion, when the pH increased up to neutral values, SiO₂NPs appeared again and the percentage of silica as SiO₂NPs was around 80% for coffee and 15% for soup and pancake [133]. The influence of the digestion process on AgNPs with and without the presence of food components (proteins, carbohydrates and fatty acids) has been also evaluated by Small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements. Particles were stable during the *in vitro* digestion procedure either in presence or in absence of food components [134].

The results of these different studies suggest that nanoparticles reach the intestine. However, very few data on the capability of nanoparticles to pass through the intestinal barrier has been reported. The human colon adenocarcinoma Caco-2 cell line has been extensively used due to its ability to undergo spontaneous differentiation, leading to the formation of a cell monolayer. This *in vitro* system simulates the mature small intestine enterocytes, both morphologically and functionally. However, this model is far away from the complexity of the *in vivo* intestinal barrier that is composed of other cells such as mucus secretory and goblet cells. However, the results provided by Caco 2-cells correlated well with *in vivo* absorption in humans which makes it quite appropriate for establishing NPs risk assessment according to EFSA regulation. Recently, Vila and co-workers reported the effects caused by the exposure of AgNPs [135]. Several parameters such as transcellular and paracellular transport, as well as the cellular uptake of AgNPs with an average size of 7.74 nm were assessed with different techniques such as confocal microscopy, transmission electron microscopy complemented with energy dispersive X-ray and ICP-MS, respectively. Additionally, the

induction of oxidative DNA damage and changes in gene expression by qPCR were also assessed. Caco-2 cell viability was not significantly affected by AgNPs showing a decrease of only 20%, after being exposed during 24 h to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Interestingly, cytotoxicity of AgNPs in differentiated cells was significantly lower than in undifferentiated cells. No significant effects were observed on the monolayer's integrity/permeability after exposure to AgNPs. The important uptake of AgNPs was not accompanied by translocation through the monolayers of Caco-2 cells. Similarly, the impact of Al containing nanoparticles on Caco-2 cells evidenced that aluminum uptake by cells occurred predominantly in particulate form, whereas ionic Al was not taken up by intestinal cell lines. None of the Al species showed cytotoxic effects up to $200 \mu\text{g Al mL}^{-1}$. The transcriptome analysis indicated effects on oxidative stress pathways. Moreover, the study showed that intestinal cellular uptake of Al occurs mainly in the nanosize form whereas toxicological effects appear to be related to the ionic aluminum [136].

As mentioned before, food matrix or food components could alter the interaction between nanoparticles and Caco-2 cells. Lichtenstein and co-workers reported that digested and undigested AgNPs in presence of food components were comparably taken up by Caco-2 cells, whereas the uptake of particles digested without food components was decreased by 60%. The results obtained may indicate that NPs can pass through the intestinal barrier and may enter in the blood stream [134]. Munger and colleagues reported the presence of silver in serum samples after ingestion of particles with diameters between 5 and 10 nm [137].

Sample preparation is a main challenge when determining NPs in food. Most of the analytical techniques employed for characterizing nanoparticles require the presence of nanoparticles in solution, therefore nanoparticles need to be firstly isolated from the complex matrix where they are suspended or embedded. Several extractants have been reported in the literature to characterize NPs in food samples [138]. Enzymatic hydrolysis has been widely used for degrading matrix and isolating NPs. The enzymes used have mainly been proteases such as Proteinase K [139], but also amylase and Macerozyme R-10 (mixture of enzymes cellulose, hemicelluloses and pectinase) [128, 139, 140]. Others extractants such as tetramethylammonium hydroxide have been employed for isolating AuNPs from rat livers [141]. In order to prevent aggregation, serum albumin was added to the homogenates. NPs stability can also be compromised during sample storage. In this regard, the short and long-term stability of SiO_2 NPs of AgNPs was checked with the purpose of preparing NPs-based RMs (SiO_2 NPs enriched tomato soup and AgNPs enriched chicken meat). Several procedures for preserving NPs and food matrix integrity were tested including sterilization, γ -irradiation, freezing, and lyophilization. Thermal sterilization produced a decrease of SiO_2 NPs size while lyophilization led to an irreversible sedimentation.

Consequently, γ - irradiation was selected for preserving SiO₂NPs tomato soup as NPs size and morphology remained unaltered. With respect to AgNPs, autoclaving favored NPs dissolution while freezing with liquid N₂ maintained NPs size and morphology

Maintaining NPs integrity is not an easy task and consequently NPs size and morphology should be checked during storage, pretreatment and sample preparation, otherwise the results obtained will not reflect the characteristics of the NPs originally present in the samples.

Nanoparticles Migration from Packaging to Food

As described above, metallic and metalloid nanoparticles (AgNPs, SiO₂NPs, ZnONPs and TiO₂NPs) have been mainly employed for developing food packaging materials, primarily with antimicrobial, antioxidant and blocking UV-Vis radiation properties. Therefore, the implementation of migration studies to assess the impact of these active packaging materials on the consumers is of great relevance. Most migration studies appeared in the literature have been performed according to European Regulation 10/2011 (EU, 2011) which sets out the rules for performing migration testing packaging plastic materials intended to come into contact with the food. Following the recommendations, a piece of plastic material is immersed in a vial containing a food simulant. The food simulants used are those listed in Table II, annex III, in particular: (A) 10% (v/v) ethanol; (B) 3% (w/v) acetic acid; (C) 20% (v/v) ethanol; and (D) vegetable oil. Aqueous food simulants A, B, and C are used to mimic foods that have a hydrophilic character and which are able to extract hydrophilic substances. Food simulant B is used in food with pH below 5. In this line, Echegoyen and Nerín [142] evaluated the release of AgNPs from different nanosilver antimicrobial food containers by using food simulants. Silver migration was observed for all samples studied, with the total silver migration values ranging between 1.66 and 31.46 ng cm⁻² (lower values than the permissible limits).

Metak, Nabhani and Connolly [143] studied the migration of AgNPs from nanosilver impregnated polymer containers and coated nanosilver films by using both food and food simulants (water and 3% acetic acid) for 10 days at 40 °C. Nano-silver coated films demonstrated a slightly higher level of migration compared with food samples stored in nanosilver containers. The highest level of migration was obtained in orange juice with maximum values of 28.92 ± 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$. TEM measurements evidenced the presence of AgNPs in food as a consequence of the migration from packaging. A study of the stability of AgNPs in 3% v/v acetic acid by AF⁴-MALS was achieved by Ntim and co-workers [144]. Their results showed that after 1 h of incubation, some Ag NPs were dissolved

and after 4 h, all AgNPs were transformed to Ag ions. Although most studies reported on the literature have been performed by using food simulants, migration studies using food matrices have also been completed. In this respect, the migration of silver from plasticized polyvinyl chloride (PVC) nanocomposites to chicken meat was evaluated by Cushen and co-workers [145]. For this purpose, meat was wrapped with the plastic film and stored at 5-20 °C for 1-4 days. The silver content of the chicken was measured by ICPMS. Silver was found in the meat at a concentration level of 0.03-8.4 mg kg⁻¹ that is below the limits of migration set for conventional migrants (no more than 60 mg kg⁻¹, or 10 mg dm⁻²). As previously stated, nanomaterials are novel substances and, consequently, they should be used with precaution. The use of nanomaterials in the food field is increasing, especially for developing active food packaging materials. Risk assessment on nanomaterials are underway, especially those concerning the evaluation of the exposure from food packaging. Accordingly, migration studies are of great importance for evaluating food packaging safety involving nanomaterials.

CONCLUDING REMARKS

The application of nanoparticles in the food sector is infinite with novel uses being continuously explored. However, their impact on consumer safety requires analytical methodologies able to fulfill the requirements established by current EU directives on nanomaterials. This chapter has put forward that determination of metal-based nanoparticles is not an easy task and a plethora of techniques with their specific advantages and disadvantages needs to be applied. Moreover, nanoparticles stability has to be preserved during the analytical steps to obtain accurate results. Quantitative extraction of nanoparticles, while keeping their original properties, remains still a challenge. Hence, it is crucial to develop robust and valid analytical methods. To this end, producing Certified Reference Materials is a key issue to support method validation and legislation to increase and assure consumer confidence.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this chapter contents have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2017-83569-C2-1-R) and the Comunidad of Madrid (Spain) and European funding from FEDER Program (project S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) for funding.

REFERENCES

- [1] European Commission. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (text with EEA relevance) (2011/696/EU) Off J EurUnion 2011; 275/38-40.
- [2] Cushen M, Kerry J, Morris M, Crux-Romero M, Cummins E. Nanotechnologies in the food industry-Recent developments, risks and regulation. Trends Food Sci Technol 2012; 24: 30-46. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.006]
- [3] Som C, Berges M, Chaudhry Q, *et al.* The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. Toxicology 2010; 269(2-3): 160-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.012] [PMID: 20025922]
- [4] Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, *et al.* Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. Beilstein J Nanotechnol 2015; 6: 1769-80. [http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.6.181] [PMID: 26425429]
- [5] REGULATION (EU) No 1169/2011 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004.
- [6] Adeyeye SAO, Fayemi OE. Nanotechnology and food processing: between innovations and consumer safety. J Culin Sci Technol 2018; 1-18. [http://dx.doi.org/10.1080/15428052.2018.1476276]
- [7] Singh T, Shukla S, Kumar P, Wahla V, Bajpai VK, Rather IA. Application of Nanotechnology in food science: perception and overview. Front Microbiol 2017; 8: 1501. [http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01501] [PMID: 28824605]
- [8] Shah SWA, Qaisar M, Jahangir M, *et al.* Influence of CMC-and guar gum-based silver nanoparticle coatings combined with low temperature on major aroma volatile component and the sensory quality of kinnow (*Citrus reticulata*). Int J Food Sci Technol 2016; 51: 2345-52. [http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.13213]
- [9] Xu J, Zhang M, Bhandari B, Kachele R. ZnO nanoparticles combined radio frequency heating: A novel method to control microorganism and improve product quality of prepared carrots. Innov Food Sci Emerg Technol 2017; 44: 46-53. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.025]
- [10] Xu J, Zhang M, Bhandari B, Cao P. Microorganism control and product quality improvement of Twice-cooked pork dish using ZnO nanoparticles combined radio frequency pasteurization. Lebensm Wiss Technol 2018; 95: 65-71. [http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.067]
- [11] Food safety and foodborne illness. World Health Organization 2017.
- [12] Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. J Control Release 2016; 224: 86-102.

- [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.008] [PMID: 26772877]
- [13] Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol* 2017; 307(8): 481-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016] [PMID: 28950999]
- [14] Srey S, Jahid IK, Ha SD. 2013 Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 2013; 31: 572-85.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001]
- [15] Speranza B, Corbo MR. The Impact of Biofilms on Food Spoilage. *The Microbiological Quality of food: foodborne spoilers*. Elsevier Ltd. 2017; Vol. 3: pp. 259-82.
- [16] Mu H, Tang J, Liu Q, Sun C, Wang T, Duan J. Potent antibacterial nanoparticle against biofilm and intracellular bacteria. *Sci Rep* 2016; 6: 18877.
[http://dx.doi.org/10.1038/srep18877] [PMID: 26728712]
- [17] Natan M, Banin E. From Nano to Micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2017; 41(3): 302-22.
[http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fux003] [PMID: 28419240]
- [18] Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 1227-49.
[http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S121956] [PMID: 28243086]
- [19] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, *et al.* Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 2012; 30(10): 499-511.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004] [PMID: 22884769]
- [20] Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology* 2017; 15(1): 65.
[http://dx.doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z] [PMID: 28974225]
- [21] Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49(2): 137-52.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011] [PMID: 28089172]
- [22] Ikuma K, Decho AW, Lau BLT. When nanoparticles meet biofilms-interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Front Microbiol* 2015; 6: 591.
[http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00591] [PMID: 26136732]
- [23] Defoirdt T. Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends Microbiol* 2018; 26(4): 313-28.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005] [PMID: 29132819]
- [24] Verbeke F, De Craemer S, Debunne N, *et al.* Peptides as Quorum Sensing Molecules: measurement techniques and obtained levels *in vitro* and *in vivo*. *Front Neurosci* 2017; 11(83): 183.
[http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2017.00183] [PMID: 28446863]
- [25] Huillet E, Tempelaars MH, André-Leroux G, *et al.* PlcRa, a new quorum-sensing regulator from *Bacillus cereus*, plays a role in oxidative stress responses and cysteine metabolism in stationary phase. *PLoS One* 2012; 7(12): e51047
[http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051047] [PMID: 23239999]
- [26] Torres-Cerna CE, Morales AJ, Alanis AY, Hernández-Vargas EA. Discrete-time neural network identification of Quorum Sensing *Escherichia coli* regulator s. IFAC-paper Online 2018; 13: 120-4.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.ifacol.2018.07.265]
- [27] Wang B, Muir TW. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol* 2016; 23(2): 214-24.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.004] [PMID: 26971873]
- [28] Kalaiarasan E, Thirumalaswamy K, Harish BN, Gnanasambandam V, Sali VK, John J. Inhibition of

- quorum sensing-controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors. *Microb Pathog* 2017; 111: 99-107.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.017] [PMID: 28818490]
- [29] Garmyn D, Gal L, Lemaitre JP, Hartmann A, Piveteau P. Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: A central role for the agr system. *Commun Integr Biol* 2009; 2(4): 371-4.
[http://dx.doi.org/10.4161/cib.2.4.8610] [PMID: 19721895]
- [30] Zheng K, Setyawati M, Leong D. Antimicrobial silver nanomaterials. *Coord Chem Rev* 2018; 357: 1-17.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.019]
- [31] Demirbas A, Yilmaz V, Ildiz N, Baldemir A, Ocsoy I. Anthocyanins-rich Berry extracts directed formation of AgNPs with the investigation of their antioxidant and antimicrobial activities. *J Mol Liq* 2017; 248: 1044-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.130]
- [32] Kujda M, Oćwieja M, Adamczyk Z, *et al.* Charge stabilized silver nanoparticles applied as antibacterial agents. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; 15(5): 3574-83.
[http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2015.9727] [PMID: 26504979]
- [33] Dogru E, Demirbas A, Altinsoy B, Duman F, Ocsoy I. Formation of *Matricaria chamomilla* extract-incorporated Ag nanoparticles and size-dependent enhanced antimicrobial property. *J Photochem Photobiol B* 2017; 174: 78-83.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.024] [PMID: 28756155]
- [34] Raza MA, Kanwal Z, Rauf A, Sabri AN, Riaz S, Naseem S. Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials (Basel)* 2016; 6(4): 74.
[http://dx.doi.org/10.3390/nano6040074] [PMID: 28335201]
- [35] Lotha R, Sundaramoorthy NS, Shamprasad BR, Nagarajan S, Sivasubramanian A. Plant nutraceuticals (Quercetin and Afzelin) capped silver nanoparticles exert potent antibiofilm effect against food borne pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhi and curtail planktonic growth in zebrafish infection model. *Microb Pathog* 2018; 120: 109-18.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.044] [PMID: 29715535]
- [36] Anjugam M, Vaseeharan B, Iswarya A, Divya M, Prabhu NM, Sankaranarayanan K. Biological synthesis of silver nanoparticles using β -1, 3 glucan binding protein and their antibacterial, antibiofilm and cytotoxic potential. *Microb Pathog* 2018; 115: 31-40.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.003] [PMID: 29208541]
- [37] Singh BR, Singh BN, Singh A, Khan W, Naqvi AH, Singh HB. Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *Sci Rep* 2015; 5: 13719.
[http://dx.doi.org/10.1038/srep13719] [PMID: 26347993]
- [38] Wagh Nee Jagtap MS, Patil RH, Thombre DK, Kulkarni MV, Gade WN, Kale BB. Evaluation of anti-quorum sensing activity of silver nanowires. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(8): 3593-601.
[http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4603-1] [PMID: 23224498]
- [39] Naik K, Kowshik M. Anti-quorum sensing activity of AgCl-TiO₂ nanoparticles with potential use as active food packaging material. *J Appl Microbiol* 2014; 117(4): 972-83.
[http://dx.doi.org/10.1111/jam.12589] [PMID: 24965598]
- [40] Mahmoodi S, Elmi A, Hallaj-Nezhadi S. Copper nanoparticles as antibacterial agents. *J Mol Pharm Org Process Res* 2018; 6: 1-7.
[http://dx.doi.org/10.4172/2329-9053.1000140]
- [41] Tovar-Corona A, Lobo-Sánchez MA, Herrera-Perez JL, Zanella R, Rodriguez-Mora JI, Vazquez-Cuchillo O. Green Synthesis of copper (0) nanoparticles with cyanidine-0-3-glucoside and its strong antimicrobial activity. *Mater Lett* 2018; 211: 266-9.

- [http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2017.10.020]
- [42] Chakra CS, Rao KV, Pavani T. Antimicrobial activity of pure Cu nano particles synthesized by surfactant varied chemical reduction method. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 2016; 6: 88-94. [http://dx.doi.org/10.1016/j.enmm.2016.06.004]
- [43] Kundu S. Gold Nanoparticles: Their application as antimicrobial agents and vehicles of gene delivery. *Adv Biotechnol Microbiol* 2017; 5: 1-4. [http://dx.doi.org/10.19080/AIBM.2017.05.555658]
- [44] Happy Agarwal, Soumya Menon, Venkat Kumar S, Rajeshkumar S. Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chem Biol Interact* 2018; 286: 60-70. [http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.008] [PMID: 29551637]
- [45] Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, *et al.* Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett* 2015; 7(3): 219-42. [http://dx.doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x] [PMID: 30464967]
- [46] Kumar R, Umar A, Kumar G, Nalwa HS. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceram Int* 2017; 43: 3940-61. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062]
- [47] Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C* 2014; 44: 278-84. [http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031] [PMID: 25280707]
- [48] Duffy LL, Osmond-McLeod MJ, Judy J, King T. Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Food Control* 2018; 92: 293-300. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.008]
- [49] Shakerimoghaddam A, Ghaemi EA, Jamali A. Zinc oxide nanoparticle reduced biofilm formation and antigen 43 expressions in uropathogenic *Escherichiacoli*. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20(4): 451-6. [PMID: 28804616]
- [50] Long M, Wang J, Zhuang H, Zhang Y, Wu H. Performance and mechanism of standard nano-TiO₂ (P-25) in photocatalytic disinfection of foodborne microorganisms-*Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2014; 39: 68-74. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.033]
- [51] Jalvo B, Faraldos M, Bahamonde A, Rosal R. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of self-cleaning surfaces functionalized by TiO₂ photocatalytic nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas putida*. *J Hazard Mater* 2017; 340: 160-70. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.005] [PMID: 28715739]
- [52] Sarkar P, Choudhary R, Panigrahi S, Syed I, Sivapratha S, Dhumal CV. Nano-inspired systems in food technology and packaging. *Environ Chem Lett* 2017; 15: 607-22. [http://dx.doi.org/10.1007/s10311-017-0649-8]
- [53] Ghanbarzadeh B, Oleyaei SA, Almasi H. Nanostructured materials utilized in biopolymer-based plastics for food packaging applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 55(12): 1699-723. [http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.731023] [PMID: 24798951]
- [54] Rhim JW, Park HM, Ha CS. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog Polym Sci* 2013; 38: 1629-52. [http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008]
- [55] Hottle TA, Bilec MM, Landis AE. Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polym Degrad Stabil* 2013; 98: 1898-907. [http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.016]
- [56] EU. Guidance to the commission regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and

intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Version 10 European commission health and consumers directorate-general directorate e-safety of the food chain E6-innovation and sustainability. 2009.

- [57] Biji KB, Ravishankar CN, Mohan CO, Srinivasa Gopal TK. Smart packaging systems for food applications: a review. *J Food Sci Technol* 2015; 52(10): 6125-35. [http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1766-7] [PMID: 26396360]
- [58] McMillin KW. Advancements in meat packaging. *Meat Sci* 2017; 132: 153-62. [http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.015] [PMID: 28465018]
- [59] Ahmed I, Lin H, Zou L, *et al.* A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control* 2017; 82: 168-73. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009]
- [60] Ariyaratna IR, Rajakaruna RMPI, Karunaratne DN. The rise of inorganic nanomaterial implementation in food applications. *Food Control* 2017; 77: 251-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.016]
- [61] Singh M, Sahareen T. Investigation of cellulosic packets impregnated with silver nanoparticles for enhancing shelf-life of vegetables. *Lebensm Wiss Technol* 2017; 86: 116-22. [http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.056]
- [62] Azlin-Hasim S, Cruz-Romero MC, Morris MA, Cummins E, Kerry JP. Effects of a combination of antimicrobial silver low density polyethylene nanocomposite films and modified atmosphere packaging on the shelf life of chicken breast fillets. *Food Packaging Shelf* 2015; 4: 26-35. [http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.03.003]
- [63] Arfat YA, Ahmed J, Jacob H. Preparation and characterization of agar-based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2017; 155: 382-90. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.097] [PMID: 27702525]
- [64] Li W, Zhang C, Chi H, *et al.* Development of antimicrobial packaging film made from Poly(Lactic Acid) incorporating titanium dioxide and silver nanoparticles. *Molecules* 2017; 22(7):E1170 [http://dx.doi.org/10.3390/molecules22071170] [PMID: 28703753]
- [65] Youssef AM, Abou-Yousef H, El-Sayed SM, Kamel S. Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *Int J Biol Macromol* 2015; 76(76): 25-32. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016] [PMID: 25709016]
- [66] Friedman M, Juneja VK. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *J Food Prot* 2010; 73(9): 1737-61. [http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1737] [PMID: 20828484]
- [67] Hernández-Muñoz P, Almenar E, Ocio M, Gavara R. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biol Technol* 2006; 39(3): 247-53. [http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.006]
- [68] Youssef AM, El-Sayed SM, Salama HH, El-Sayed HS, Dufresne A. Evaluation of bionanocomposites as packaging material on properties of soft white cheese during storage period. *Carbohydr Polym* 2015; 132: 274-85. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.075] [PMID: 26256350]
- [69] Zhang X, Xiao G, Wang Y, Zhao Y, Su H, Tan T. Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. *Carbohydr Polym* 2017; 169(169): 101-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.073] [PMID: 28504125]
- [70] Salarbashi D, Tafaghodi M, Bazzaz BSF, Jafari B. Characterization of soluble soybean (SSPS) polysaccharide and development of eco-friendly SSPS/TiO₂ nanoparticle bionanocomposites. *Int J Biol Macromol* 2018; 112: 852-61. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.182] [PMID: 29410370]

- [71] Salarbashi D, Tafaghodi M, Bazzaz BSF. Soluble soybean polysaccharide/TiO₂ bionanocomposite film for food application. *Carbohydr Polym* 2018; 186: 384-93. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.081] [PMID: 29456001]
- [72] Roilo D, Maestri CA, Scarpa M, Bettotti P, Checchetto R. Gas barrier and optical properties of cellulose nanofiber coatings with dispersed TiO₂ nanoparticles. *Surf Coat Tech* 2017; 343: 131-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.10.015]
- [73] El-Feky OM, Hassan EA, Fadel SM, Hassan ML. Use of ZnO nanoparticles for protecting oil paintings on paper support against dirt, fungal attack, and UV aging. *J Cult Herit* 2014; 15(2): 465-72. [http://dx.doi.org/10.1016/j.culher.2013.01.012]
- [74] EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids. Scientific opinion on the safety evaluation of the substance zinc oxide, nanoparticles, uncoated and coated with [3-(methacryloxy)propyl] trimethoxysilane, for use in food contact materials. *EFSA J* 2015; 13(4): 4063-72.
- [75] Castro-Mayorga JL, Fabra MJ, Pourrahimi AM, Olsson RT, Lagaron JM. The impact of zinc oxide particle morphology as an antimicrobial and when incorporated in poly(3-hydroxybutyrate-c-3-hydroxyvalerate) films for food packaging and food contact surfaces applications. *Food Bioprod Process* 2017; 101: 32-44. [http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.007]
- [76] Rahman PM, Mujeeb VMA, Muraleedharan K. Flexible chitosan-nano ZnO antimicrobial pouches as a new material for extending the shelf life of raw meat. *Int J Biol Macromol* 2017; 97(97): 382-91. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.052] [PMID: 28104367]
- [77] Tankhiwale R, Bajpai SK. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 90: 16-20. [http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.031] [PMID: 22015180]
- [78] Zhang H, Hortal M, Jordá-Beneyto M, Rosa E, Lara-Lledo M, Lorente I. ZnO-PLA nanocomposite coated paper for antimicrobial packaging application. *Lebensm Wiss Technol* 2017; 78: 250-7. [http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.024]
- [79] Jafarzadeh S, Ariffin F, Mahmud S, Alias AK, Hosseini SF, Ahmad M. Improving the physical and protective functions of semolina films by embedding a blend nanofillers (ZnO-nr and nano-kaolin). *Food Packag Shelf Life* 2017; 12: 66-75. [http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.03.001]
- [80] Roy N, Saha N, Kitano T, Saha P. Biodegradation of PVP-CMC hydrogel film: a useful food packaging material. *Carbohydr Polym* 2012; 89(2): 346-53. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.008] [PMID: 24750729]
- [81] Oun AA, Rhim JW. Carrageenan-based hydrogels and films: Effect of ZnO and CuO nanoparticles on the physical, mechanical, and antimicrobial properties. *Food Hydrocoll* 2017; 67: 45-53. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.040]
- [82] Liu JM, Hu Y, Yang YK, *et al.* Emerging functional nanomaterials for the detection of food contaminants. *Trends Food Sci Technol* 2018; 71: 94-106. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.005]
- [83] Fuertes G, Soto I, Carrasco R, Vargas M, Sabatin J, Lagos C. Intelligent packaging systems: sensors and nanosensors to monitor food quality and safety. *J Sens* 2016; 2: 1-8. [http://dx.doi.org/10.1155/2016/4046061]
- [84] Du J, Sing H, Dong W, Bai YH, Yi TH. Colorimetric detection of *Listeria monocytogenes* using one-pot biosynthesized lower-shaped gold nanoparticles. *Sens Actuators B Chem* 2018; 265: 285-92. [http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.067]
- [85] Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Maragò OM, Iati MA. Surface plasmon resonance in gold

- nanoparticles: a review. *J Phys Condens Matter* 2017; 29(20):203002 [http://dx.doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3] [PMID: 28426435]
- [86] Lim S, Gunasekaran S, Imm JY. Gelatin-templated gold nanoparticles as novel time-temperature indicator. *J Food Sci* 2012; 77(9): N45-9. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02872.x] [PMID: 22900571]
- [87] Ansari AA, Kaushik A, Solanki PR, Malhotra BD. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection. *Bioelectrochemistry* 2010; 77(2): 75-81. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.06.014] [PMID: 19648064]
- [88] Cabañes FJ, Bragulat MJ. Black aspergilli and ochratoxin A-producing species. *Curr Opin Food Sci* 2018; 23: 1-10. [http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.006]
- [89] Shao B, Ma X, Zhao S, *et al.* Nanogapped Au_(core)@Au-Ag_(shell) structures coupled with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the detection of Ochratoxin A. *Anal Chim Acta* 2018; 1033: 165-72. [http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.058] [PMID: 30172322]
- [90] Nesakumar N, Thandavan K, Sethuraman S, Krishnan UM, Rayappan JB. An electrochemical biosensor with nanointerface for lactate detection based on lactate dehydrogenase immobilized on zinc oxide nanorods. *J Colloid Interface Sci* 2014; 414: 90-6. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.052] [PMID: 24231089]
- [91] Rauscher H, Rasmussen K, Sokull-Kluttgen B. Regulatory aspects of nanomaterials in the EU. *Chemieingenieurtechnik (Weinh)* 2017; 89(3): 224-31. [http://dx.doi.org/10.1002/cite.201600076]
- [92] Jain A, Ranjan S, Dasgupta N, Ramalingam C. Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58(2): 297-317. [http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1160363] [PMID: 27052385]
- [93] European Commission. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on food additives (text with EEA relevance). *Off J Eur Union* 2008; 354/16-33.
- [94] Yusoff R, Nguyen LTH, Chiew P, Wang ZM, Ng KW. Comparative differences in the behaviour of TiO₂ and SiO₂ food additives in food ingredient solutions. *J Nanopart Res* 2018; 20: 76. [http://dx.doi.org/10.1007/s11051-018-4176-8]
- [95] Dufefoi W, Moniz K, Allen-Vercos E, Ropers MH, Walker VK. Impact of food grade and nano-TiO₂ particles on a human intestinal community. *Food Chem Toxicol* 2017; 106(Pt A): 242-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.050] [PMID: 28564612]
- [96] Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *EFSA J* 2016; 14(9): 4545.
- [97] Peters RJB, van Bommel G, Herrera-Rivera Z, *et al.* Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J Agric Food Chem* 2014; 62(27): 6285-93. [http://dx.doi.org/10.1021/jf5011885] [PMID: 24933406]
- [98] Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J* 2018; 16(1): 5088.
- [99] European Commission. Regulation (EU) 2015/2283 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/ 2001. *Off J Eur Union* 2015; 327/1-327/22.
- [100] European Commission. Commission implementing regulation (EU) 2017/2470 of December 2017 establishing the Union list of novel food in accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council no novel foods. *Off J Eur Union* 2017; 351/72-351/201.

- [101] European Commission. Commission regulation (EC) No 450/2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Off EurUnion 2009; 135/3-135/11.
- [102] European Commission. Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. (Text with EEA relevance). Off J EurUnion 2011; 12/1-12/89.
- [103] Oomen AG, Steinhäuser KG, Bleeker EAJ, *et al.* Risk assessment frameworks for nanomaterials: scope, link to regulations, applicability, and outline for future directions in view of needed increase in efficiency. NanoImpact 2018; 9: 1-13.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2017.09.001]
- [104] Guidance on risk assessment of the nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. EFSA J 2018; 16(7): 5327.
- [105] European Commission. Communication from the commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. Second regulatory review on nanomaterials. (Text with EEA relevance). Off J EurUnion 2012; 12/1-12/89.
- [106] Dudkiewicz A, Tiede K, Loeschner LHS, Jensen E, Wierzbicki R, Molhav K. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. Trends Analyt Chem 2011; 30(1): 28-43.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.10.007]
- [107] Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. Anal Chem 2014; 86(5): 2270-8.
[http://dx.doi.org/10.1021/ac402980q] [PMID: 24308527]
- [108] Naasz S, Weigel S, Borovinskaya O, *et al.* Multi-element analysis of single nanoparticles by ICP-MS using quadrupole and time-of-flight technologies. J Anal At Spectrom 2018; 33: 835-45.
[http://dx.doi.org/10.1039/C7JA00399D]
- [109] Praetorius A, Gundlach-Graham A, Goldberg E, *et al.* Single-particle multi-element fingerprinting (spMEF) using inductively-coupled plasma time-of-flight mass spectrometry (ICP-TOFMS) to identify engineered nanoparticles against the elevated natural background in soils. Environ Sci Nano 2017; 4: 307-14.
[http://dx.doi.org/10.1039/C6EN00455E]
- [110] Hendriks L, Gundlach-Graham A, Hattendorf B, Günther D. Characterization of a new ICP-TOFMS instrument with continuous and discrete introduction of solution. J Anal At Spectrom 2017; 32: 548-61.
[http://dx.doi.org/10.1039/C6JA00400H]
- [111] Pitkänen L, Striegel AM. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. Trends Analyt Chem 2016; 80: 311-20.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.013] [PMID: 27335508]
- [112] Pitkänen L, Montoro Bustos AR, Murphy KE, Winchester MR, Striegel AM. Quantitative characterization of gold nanoparticles by size-exclusion and hydrodynamic chromatography, coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and quasi-elastic light scattering. J Chromatogr A 2017; 1511: 59-67.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.064] [PMID: 28697934]
- [113] Giddings JC. A new separation concept based on a coupling of concentration and flow non uniformities. Sep Sci 1996; 1: 123.
[http://dx.doi.org/10.1080/01496396608049439]
- [114] Von der Kammer F, Legros S, Larsen EH, Loeschner K, Hofmann T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. Trends Analyt Chem 2011; 30: 425-36.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.012]
- [115] Gigault J, Pettibone JM, Schmitt C, Hackley VA. Rational strategy for characterization of nanoscale

- particles by asymmetric-flow field flow fractionation: a tutorial. *Anal Chim Acta* 2014; 809: 9-24. [http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.021] [PMID: 24418128]
- [116] Loeschner K, Navratilova J, Legros S, *et al.* Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of silver nanoparticles. *J Chromatogr A* 2013; 1272: 116-25. [http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.053] [PMID: 23261297]
- [117] Linsinger TP, Chaudhry Q, Dehalu V, *et al.* Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food. *Food Chem* 2013; 138(2-3): 1959-66. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.074] [PMID: 23411331]
- [118] von Moos N, Slaveykova VI. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae--state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology* 2014; 8(6): 605-30. [http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.809810] [PMID: 23738945]
- [119] Palomo-Siguero M, Madrid Y. Exploring the behavior and metabolic transformations of SeNPs in exposed Lactic Acid Bacteria. Effect of nanoparticles coating agent. *Int J Mol Sci* 2017; 18(8): 1712. [http://dx.doi.org/10.3390/ijms18081712] [PMID: 28783048]
- [120] Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology* 2013; 11: 26-38. [http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-11-26] [PMID: 23870291]
- [121] Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev* 2011; 111(9): 5610-37. [http://dx.doi.org/10.1021/cr100440g] [PMID: 21688848]
- [122] Lacerda SH, Park JJ, Meuse C, *et al.* Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano* 2010; 4(1): 365-79. [http://dx.doi.org/10.1021/nn9011187] [PMID: 20020753]
- [123] Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D, Minchin RF. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 2009; 20(45): 455101. [http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/20/45/455101] [PMID: 19822937]
- [124] Deng ZJ, Liang M, Toth I, Monteiro M, Minchin RF. Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. *Nanotoxicology* 2013; 7(3): 314-22. [http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2012.655342] [PMID: 22394123]
- [125] Zhang W, Xiao B, Fang T. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere* 2018; 191: 324-34. [http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.016] [PMID: 29045933]
- [126] Grombe R, Charoud-Got J, Emteborg H, *et al.* Production of reference materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 8185-95. [PMID: 24390460]
- [127] Peters RJB, Rivera ZH, van Bommel G, Marvin HJP, Weigel S, Bouwmeester H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(16): 3875-85. [http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7571-0] [PMID: 24390462]
- [128] Loeschner K, Navratilova J, Købler C, *et al.* Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(25): 8185-95. [http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7228-z] [PMID: 23887279]
- [129] Gomez-Gomez B, Perez-Corona MT, Madrid Y. Effect of food matrix on ZnONPs stability. 9th Franco-Spanish workshop on Bio-inorganic Analytical Chemistry. Huelva. 2017.
- [130] Böhmert L, Girod M, Hansen U, *et al.* Analytically monitored digestion of silver nanoparticles and their toxicity on human intestinal cells. *Nanotoxicology* 2014; 8(6): 631-42.

- [http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.815284] [PMID: 23763544]
- [131] Mwilu SK, El Badawy AM, Bradham K, *et al.* Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. *Sci Total Environ* 2013; 447: 90-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.036] [PMID: 23376520]
- [132] Walczak AP, Fokkink R, Peters R, *et al.* Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an *in vitro* human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology* 2013; 7(7): 1198-210.
[http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2012.726382] [PMID: 22931191]
- [133] Peters R, Kramer E, Oomen AG, *et al.* Presence of nano-sized silica during *in vitro* digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano* 2012; 6(3): 2441-51.
[http://dx.doi.org/10.1021/nn204728k] [PMID: 22364219]
- [134] Lichtenstein D, Ebmeyer J, Knappe P, *et al.* Impact of food components during *in vitro* digestion of silver nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity in intestinal cells. *Biol Chem* 2015; 396(11): 1255-64.
[http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2015-0145] [PMID: 26040006]
- [135] Vila L, García-Rodríguez A, Cortés C, Marcos R, Hernández A. Assessing the effects of silver nanoparticles on monolayers of differentiated Caco-2 cells, as a model of intestinal barrier. *Food Chem Toxicol* 2018; 116(Pt B): 1-10.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.008] [PMID: 29626574]
- [136] Sieg H, Braeuning C, Kunz BM, *et al.* Uptake and molecular impact of aluminum-containing nanomaterials on human intestinal caco-2 cells. *Nanotoxicology* 2018; 12(9): 992-1013.
[http://dx.doi.org/10.1080/17435390.2018.1504999] [PMID: 30317887]
- [137] Munger MA, Radwanski P, Hadlock GC, *et al.* *In vivo* human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 2014; 10(1): 1-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.06.010] [PMID: 23811290]
- [138] De la Calle I, Menta M, Sébe F. Current trends and challenges in sample preparation for metallic nanoparticles analysis in daily products and environmental samples: A review. *Spectrochim Acta B At Spectrosc* 2016; 125: 66-96.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2016.09.007]
- [139] Beltrami D, Calestani D, Maffini M, *et al.* Development of a combined SEM and ICP-MS approach for the qualitative and quantitative analyses of metal microparticles and sub-microparticles in food products. *Anal Bioanal Chem* 2011; 401: 1401-9.
[http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5149-2] [PMID: 21660413]
- [140] Dan Y, Zhang W, Xue R, Ma X, Stephan C, Shi H. Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis. *Environ Sci Technol* 2015; 49(5): 3007-14.
[http://dx.doi.org/10.1021/es506179e] [PMID: 25633589]
- [141] Schmidt B, Loeschner K, Hadrup N, *et al.* Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 2011; 83(7): 2461-8.
[http://dx.doi.org/10.1021/ac102545e] [PMID: 21355549]
- [142] Echegoyen Y, Nerín C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 16-22.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014] [PMID: 23954768]
- [143] Metak AM, Nabhani F, Connolly SN. Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products. *Lebensm Wiss Technol* 2015; 64: 781-7.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.001]
- [144] Addo Ntim S, Thomas TA, Begley TH, Noonan GO. Characterisation and potential migration of silver

nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 2015; 32(6): 1003-11.

[<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1029994>] [PMID: 25831019]

- [145] Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E. Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite. Food Chem 2013; 139(1-4): 389-97.

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.045>] [PMID: 23561122]

Bentham Science Publishers
Not For Sale

ANEXO B: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos científicos incluidos en la Tesis Doctoral

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Madrid, Y. Availability of zinc from infant formula by *in vitro* methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99, 9405-9414.

Pescuma, M., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Font, G., Madrid, Y., Mozzi, F. Food prospect of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. *J. Funct. Food*, 2017, 35, 466-473.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., Pescuma, M., Madrid Y. Silac-based quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 response to the presence of selenite and selenium nanoparticles. *J. Proteomics*, 2019, 195, 53-65.

Gomez-Gomez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, T., Madrid, Y. Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in *quorum sensing*-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation. *Metallomics*, 2019, 11, 1104.

Gomez-Gomez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, T., Madrid, Y. Unravelling mechanism of bacterial *quorum sensing* disruption by metal-based nanoparticles. *Sci. Total Environ.*, 2019, 696, 133869.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Madrid, Y. Using single-particle ICP-MS for unravelling the effect of type of food on the physicochemical properties and gastrointestinal stability of ZnONPs released from packaging materials. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1100, 12-21.

Gómez-Gómez, B., Sanz-Landaluze, J., Pérez-Corona, T., Madrid, Y. Fate and effect of in-house synthesized tellurium based nanoparticles on bacterial biofilm biomass and architecture. Challenges for nanoparticles characterization in living systems. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137501> (Aceptado).

Gómez-Gómez, B., Corte-Rodriguez, M., Pérez-Corona, M.T., Bettmer, J., Montes-Bayon, M., Madrid, Y. Single-cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate bacterial uptake and morphological changes of tellurium nanoparticles. *Anal. Chem.* (enviado).

Otros artículos científicos

Vicente-Zurdo, D., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. Impact of fish growing conditions and cooking methods on selenium species in swordfish and salmon fillets. *J. Food Compos. Anal.*, 2019, 83, 103275.

Manousi, N., Gómez-Gómez, B., Madrid, Y., Deliyanni, E.A., Zachariadis, G.A. Determination of rare earth elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry after dispersive solid phase extraction with novel oxidized grapheme oxide and optimization with response surface methodology and central composite design. *Microchem. J.*, 2020, 152, 104428.

Bayouli, I. T., Gómez-Gómez, B., Bayouli, H.T., Pérez-Corona, T., Meers, E., Ammar, E., Ferchichi, A., Madrid Y. Heavy metal transport and fate in soil-plant system: study case of industrial cement vicinity, Tunisia. *Arab. J. Geosci.*, 2020, 13:75.

Capítulos de libro

Gómez- Gómez, B., Madrid, Y. Nanotechnology in the food field. Application of metal-based nanoparticles. *Current and Future Developments in Food Science*, 2019, 1, 87-127.

Comunicaciones a congresos

Madrid, Y., Pérez Corona, M.T., Gómez Gómez, B. "Bioaccesibilidad de cinc en formulas infantiles mediante estudios *in vitro* y análisis por SEC-ICPMS". Tipo de participación: **Poster**. Congreso 14^{AS} Jornadas De Análisis Instrumental (JAIS). Barcelona, España, Octubre de 2014.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Madrid, Y. "Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de zinc. Efecto de ZnONPs frente a levaduras y bacterias lácticas". Tipo de Participación: **Póster**. XX Reunión De La Sociedad Española De Química Analítica. Santiago de Compostela, Julio de 2015.

Madrid, Y., Gómez-Gómez, B., Pérez Corona, M.T. "Synthesis and characterization of zinc nanoparticles to improve zinc bioavailability in infant formulas". Tipo de participación: **Póster**. EUROFOODCHEM XVII: Upcoming Challenges In Food Science. Madrid, España, Octubre de 2015.

Pescuma, M., Gómez-Gómez, B., Font, G., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., Madrid, Y. "Biotransformation of Selenium by *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus acidophilus* CRL 636. Tipo de participación: **Póster**. V International Symposium On Lactic

Acid Bacteria. Benefitting from Lactic Acid Bacteria Progress in Health and Food. San Miguel de Tucumán, Argentina, Octubre de 2016.

Pescuma, M., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, T., Font, G., Madrid, Y., Mozzi, F. Food prospects of selenium enriched-Lactobacillus acidophilus CRL 636 and Lactobacillus reuteri CRL 1101. Tipo de participación: **Póster**. 12th International Symposium On Lactic Acid Bacteria. Egmond and zee, Holanda, Agosto de 2017.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. "Flame Atomic Absorption Spectrometry for direct ZnO-NPs analysis in water and fruit juice. Effect of food matrix in ZnO-NPs stability and bioaccessibility". Tipo de participación: **Póster**. XXI Reunión De La Sociedad Española De Química Analítica. Valencia, España, Septiembre de 2017.

Pérez-Corona, T., Matías-Soler, J., Gómez-Gómez, B. Rosales-Conrado, N., Madrid-Albarrán, Y. "Green biosynthesis of Tellurium nanoparticles using tea infusions as a natural source of polyphenols". Tipo de participación: **Póster**. XXI Reunión De La Sociedad Española De Química Analítica. Valencia, España, Septiembre de 2017.

Vicente Zurdo, D., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. "Especiación de selenio en muestras de pez espada y salmón, mediante HPLC-ICP-MS. Influencia del proceso de cocinado". Tipo de participación: **Oral**. Jornada de Especiación (Pre-symposium on speciation and regulation in food). XXI Reunión De La Sociedad Española De Química Analítica. Valencia, España, Septiembre de 2017.

Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. "Effect of food matrix on ZnO-NPs stability. Evaluation by a multitechnique platform". Tipo de participación: **Oral**. 9TH International Franco-Spanish Workshop On Bio-Inorganic Analytical Chemistry. Huelva, España, Septiembre de 2017.

Rosales-Conrado, N., Matías-Soler, J., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. "Synthesis of inorganic nanoparticles using tea extracts". Tipo de participación: **Oral**. 9TH International Franco-Spanish Workshop On Bio-Inorganic Analytical Chemistry. Huelva, España, Septiembre de 2017.

Gómez-Gómez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, M.T., Madrid Y. "Antibiofilm effect of selenium nanoparticles against common pathogens". Tipo de participación: **Oral**. ISEAC-40 International Conference On Environmental & Food Monitoring. Santiago de Compostela, España, Junio de 2018.

Gomez Gomez, B., Sanz Landaluce, J., Pérez Corona, T, Madrid Y. "Synthesis and characterization of tellurium based nanoparticles through a multitechnique platform including hyphenated ICP-MS techniques. Tipo de comunicación: **Póster**. European Winter Conference On Plasma Spectrochemistry. Pau, Francia, Febrero de 2019.

Abad-Alvaro I, Gomez-Gomez B, Bartczak D, Cuello-Nunez S, Madrid Y, Goenaga-Infante H. A systematic comparison between millisecond and microsecond dwell time SP-ICP MS for the selective discrimination of silver nanoparticles from ionic silver as required for biomedical applications. Tipo de comunicación: **Póster**. European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. Pau, Francia, Febrero de 2019.

Gómez-Gómez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y. "Unravelling mechanisms of bacterial quorum sensing disruption by metal and metalloid-based nanoparticles". Tipo de comunicación: **Oral**. IX International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology. Zaragoza, 2-4 Julio 2019.

Estancias de investigación y colaboraciones.

Colaboración con el grupo de Microbiología, Ecología y Biotecnología del Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid en el estudio del efecto de nanopartículas metálicas y de metaloides en procesos regulados por *quorum sensing*.

Estancia en el grupo de Análisis Inorgánico del LGC en Londres (Reino Unido) para llevar a cabo estudios sobre la técnica SP-ICP-MS para la discriminación de plata disuelta y en forma de nanopartícula en matrices complejas.

Estancia en el Grupo de Espectrometría de Masas y Análisis Biomédico (EMAB) de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo para la realización de estudios de acumulación de nanopartículas de metaloides en organismos modelo mediante la técnica single-cell ICP-MS.

